



**UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA**

**Uso de cepas de *Bacillus* spp. para el pre-
tratamiento de residuos lignocelulósicos en fases
previas al proceso de compostaje.**

**Máster en Biotecnología Industrial y
Agroalimentaria**

Autora:

Nataly Tatiana Coronel Montesdeoca.

Directores:

Francisca Suárez Estrella.

Juan Antonio López González.

Curso: 2021-2022

Convocatoria Mayo

Agradecimientos

Desde el fondo de mi corazón agradezco a Dios y a la Virgen Dolorosa por todas sus bendiciones recibidas, por no desampararme en un país tan lejano de mi familia y haberme permitido y facilitado vivir esta experiencia. A mis padres por todo su apoyo incondicional y esfuerzo desmesurado para que yo cumpla con este propósito, a mis hermanas, hermano, cuñado y sobrinas por sentirse felices y orgullosos de mí.

También agradezco a María José López, responsable del grupo de investigación donde he desarrollado mi trabajo, a mis tutores Paqui Suárez y Juan Antonio López, a Jesús Salinas y a todo el grupo de investigación del laboratorio de Microbiología por ayudarme y guiarme en esta investigación, y lo más importante haberme demostrado su calidad humana en esta experiencia para mí que, sin duda, recordaré toda mi vida.

Dios les pague a todos,

Nataly.

Índice

Agradecimientos.....	i
Índice.....	ii
Resumen.....	iv
Abstract	iv
1. Introducción.....	1
1.1. <i>Problemática derivada de la generación de residuos agrícolas</i>	1
1.2. <i>Alternativas para la gestión de residuos agrícolas</i>	4
1.3. <i>Compostaje</i>	5
1.4. <i>Bioconversión de biomasa lignocelulósica durante el compostaje</i>	8
1.5. <i>Aplicación de inoculantes microbianos para la obtención de compost de calidad</i>	9
1.6. <i>Pretratamiento biológico de residuos orgánicos con microorganismos lignocelulolíticos</i> 11	
2. Justificación y objetivos.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. <i>Material vegetal</i>	15
3.2. <i>Microorganismos</i>	15
3.3. <i>Medios de cultivo y reactivos</i>	16
3.4. <i>Diseño Experimental</i>	17
3.5. <i>Acondicionamiento del material vegetal de partida</i>	18
3.6. <i>Preparación del inóculo</i>	19
3.7. <i>Inoculación de la mezcla de materias primas y condiciones de incubación</i>	20
3.8. <i>Parámetros de seguimiento</i>	20

3.8.1.	Humedad, Materia Orgánica y Cenizas	21
3.8.2.	Relación C/N	22
3.8.3.	Análisis Respirométrico: Índice Respirométrico Acumulado (AT ₄)	22
3.8.4.	Análisis de fibras: contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina y tasas de degradación	24
3.9.	<i>Análisis estadístico</i>	26
4.	Resultados y discusión.....	26
4.1.	<i>Influencia del pretratamiento biológico sobre el porcentaje de Humedad, Materia Orgánica y Cenizas</i>	26
4.1.1.	Humedad.....	26
4.1.2.	Materia Orgánica y Cenizas	28
4.2.	<i>Relación C/N</i>	30
4.3.	<i>Análisis respirométrico</i>	32
4.4.	<i>Fracciones lignocelulósicas y Tasas de Biodegradación</i>	34
4.4.1.	Porcentaje de Hemicelulosa y Tasa de Biodegradación.....	35
4.4.2.	Porcentaje de Celulosa y Tasa de Biodegradación	36
4.4.3.	Porcentaje de Lignina y Tasa de Biodegradación	38
5.	Conclusiones.....	40
6.	Financiación	41
7.	Bibliografía.....	41

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de dos cepas termotolerantes y ligninocelulolíticas de *Bacillus* spp. en etapas previas al proceso de compostaje, como agentes activadores de la degradabilidad de residuos vegetales procedentes de la agricultura intensiva. El material de partida estuvo compuesto de restos de plantas de tomate y restos de poda mezclados en una proporción (50:50 v/v). Los microorganismos lignocelulolíticos formaban parte de la colección de cepas propia del grupo de investigación "BIO-175" de la Universidad de Almería, habiendo sido identificadas previamente como *Bacillus safensis* 190 y *Bacillus licheniformis* 1974. Una vez acondicionados los materiales de partida, se inoculó la mezcla de residuos con ambas cepas microbianas de forma independiente, a dosis alta (10^6 UFC/g de residuo) y baja (10^4 UFC/g de residuo) de inóculo, estableciéndose posteriormente muestreos a los 10 y 30 días después del inicio del tratamiento. Para determinar la capacidad de ambas cepas para activar la biodegradación de las mezclas se evaluaron los siguientes parámetros: humedad, materia orgánica, cenizas, relación C/N, respirometría y contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina, a lo largo de los 30 días que duró el ensayo. Los resultados mostraron que el tratamiento con las cepas *B. licheniformis* 1974 y *B. safensis* 190 influyó en el carácter biodegradable de las mezclas inoculadas después de 10 días de incubación, lo que se tradujo en valores de AT_4 superiores a los observados en las muestras no tratadas, así como en una leve reducción de la relación C/N y del contenido en Materia Orgánica. Además, la inoculación con ambas cepas aceleró la degradación de la celulosa en comparación a lo observado en los controles sin inocular, mientras que la degradación de hemicelulosa y lignina fue más notable entre 10 y 30 días desde la aplicación de los tratamientos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of the application of two thermotolerant and ligninocellulolytic strains of *Bacillus* spp. in stages prior to the composting process, as agents activating the degradability of plant residues from intensive agriculture. The starting material was composed of tomato plant remains and pruning residues mixed in a ratio (50:50 v/v). The lignocellulolytic microorganisms were part of the collection of strains belonging to the "BIO-175" research group of the University of Almeria, having been previously identified as *Bacillus safensis* 190 and *Bacillus licheniformis* 1974. Once the starting materials were conditioned, the mixture was inoculated with both microbial strains independently, at high (10^6 CFU/g residue) and low (10^4 CFU/g residue) inoculum doses, and samples were taken 10 and 30 days after the beginning of the treatment. To determine the capacity of both strains to activate the biodegradation of the mixtures, the following parameters were evaluated: moisture, organic matter, ash, C/N ratio, respirometry and cellulose, hemicellulose and lignin content, throughout the 30 days of the trial. The results showed that treatment with strains *B. licheniformis* 1974 and *B. safensis*

190 influenced the biodegradability of the inoculated mixtures after 10 days of incubation, which resulted in higher AT⁴ values than those observed in the untreated samples, as well as a slight reduction in the C/N ratio and organic matter content. In addition, inoculation with both strains accelerated cellulose degradation compared to that observed in the uninoculated controls, while hemicellulose and lignin degradation was more noticeable between 10 and 30 days after the application of the treatments.

1. Introducción

1.1. Problemática derivada de la generación de residuos agrícolas

El mundo actual se enfrenta a numerosos problemas ambientales y humanitarios. Así, debido al incesante incremento de la población, es necesario producir cada vez más alimentos para dar solución a los terribles problemas de desabastecimiento mundial (Rombel et al., 2022). Una de las consecuencias derivadas de la enorme demanda de alimentos es la generación masiva de residuos de muy diversa naturaleza (Chávez & Rodríguez, 2016). Así, a nivel mundial (Gráfico 1), se estima que cerca del 46% del total de residuos sólidos (RS) son residuos sólidos orgánicos (RSO).

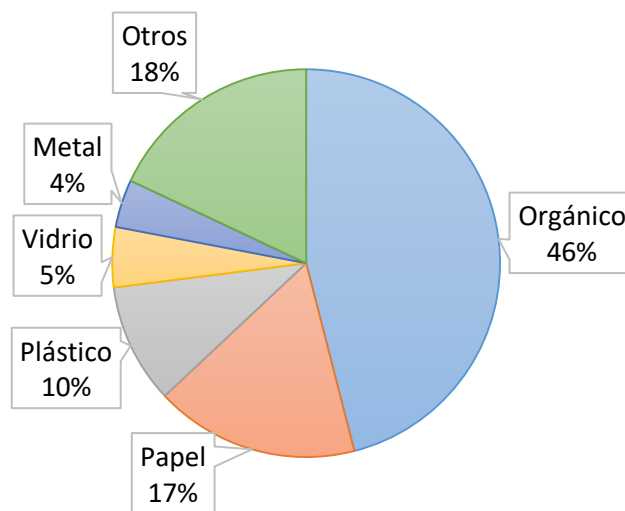


Gráfico 1: Tipos de residuos sólidos generados a nivel mundial.

Fuente: Hoornweg & Bhada-Tata (2012)

La industria agroalimentaria es el principal sector manufacturero de Europa (Pascual et al., 2018). En este sector se generan enormes cantidades de RSO de naturaleza lignocelulósica en todo el mundo (Greff et al., 2022). En concreto, según datos del Instituto Tecnológico de la Industria Agroalimentaria (AINIA), en España, el 73% de los residuos orgánicos relacionados con el sector primario corresponden a la actividad agrícola (Gallego et al., 2019).

En la provincia de Almería la actividad agrícola intensiva se considera el principal motor socioeconómico (Figura 1) (Guisado, 2008). Dicha actividad, se desarrolla en una superficie cercana a las 32.554 hectáreas de cultivo bajo plástico (Cajamar, 2021) (Foto 1), donde se cultivan diferentes tipos de variedades vegetales (Tabla 1). Se estima que la superficie ocupada por estos invernaderos representa el 69% de la superficie correspondiente al total de Andalucía (Junta de Andalucía, 2010).



Figura 1: Principales comarcas agrícolas de la Provincia de Almería. **Fuente:** Valera et al. (2014).



Foto 1: Vista aérea de los invernaderos. **Fuente:** López et al. 2016.

Tabla 1: Principales cultivos de la Provincia de Almería.

Cultivo	Producción(miles t)
Pimiento	852
Tomate	739
Sandía	578
Pepino	511
Berenjena	202
Melón	132

Fuente: Cajamar (2021)

Sin embargo, uno de los problemas principales derivados de esta intensa actividad agrícola, es la generación y acumulación de enormes cantidades de residuos vegetales. Se estima que la cantidad de residuos agrícolas producidos en la provincia de Almería gira en torno a los 2

millones de toneladas anuales (Tierra, 2022). Estos residuos son básicamente restos de plantas, aunque también incluyen los frutos que no se pueden comercializar por su apariencia o calidad, o a la vez los excesos de producción. También, comprenden los residuos de cultivos leñosos (restos de poda del olivar, almendro, viñedo, cítricos etc.) y los residuos de cultivos herbáceos (paja de cereal, restos del cultivo del algodón, cañote de girasol o maíz, etc.) (Junta de Andalucía, 2010).

En términos generales, el problema derivado de la generación masiva de residuos en zonas con una actividad agrícola intensiva en crecimiento (Gráfico 2), es la ausencia de una adecuada gestión de los mismos, mediante alternativas respetuosas con el medio ambiente y que sirvan como vías de revalorización de dichos residuos (Gallego et al., 2019)

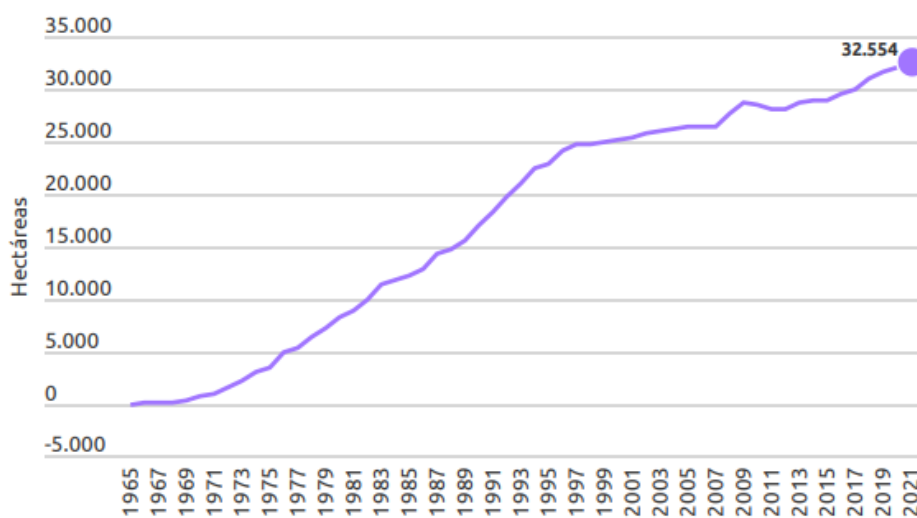


Gráfico 2: Evolución de la superficie de invernaderos en la Provincia de Almería utilizadas en agricultura intensiva desde el año 1965 hasta 2021 en hectáreas. **Fuente:** Cajamar (2021).

Una gestión inadecuada de este tipo de residuos, y en general, de los residuos de naturaleza orgánica, puede afectar negativamente a la salud, el clima, el medio ambiente e incluso la economía, lo que significa que los costes de hacer frente a los daños causados, podrían ser superiores al coste inicial de una gestión adecuada de los mismos (Obsa et al., 2022). Los impactos ambientales negativos podrían afectar a corrientes de agua, matrices de suelo y subsuelo, y a la atmósfera, en forma de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (Hernández et al., 2022). En relación a esto último, se conoce que la generación de GEI a escala mundial en el año 2016 fue de 1600 millones de toneladas de dióxido de carbono equivalente (CO₂e), con un incremento proyectado para el año 2050 de 2600 millones de toneladas de CO₂e (Hoorweg & Bhada-Tata, 2012). Del total de emisiones mundiales de CO₂e, el 5 % derivan de la gestión de residuos sólidos.

Por otra parte, no hay que olvidar que, según Hernández et al. (2022) la generación mundial de residuos sólidos urbanos en el año 2016 ascendió a 2,01 billones de toneladas anuales y se prevé que aumente a 3,4 billones en el año 2050.

Por tanto, teniendo en cuenta los datos referidos anteriormente en relación a la generación global de residuos orgánicos, como en concreto, respecto a la generación masiva de restos agroindustriales, resulta imprescindible seleccionar alternativas de gestión de este tipo de residuos que tengan un carácter sostenible, y puedan ser aplicadas a escala mundial. Este es el importante desafío al que se enfrentan gobiernos de todo el mundo (Obsa et al., 2022).

1.2. Alternativas para la gestión de residuos agrícolas

Las principales alternativas para el tratamiento de los residuos orgánicos dependen en gran medida del tipo de residuo y del modo en el que se lleve a cabo su recogida. Para los residuos que provienen de una separación selectiva en origen, las alternativas son amplias, desde tratamientos térmicos complejos y costosos, como la pirólisis o la gasificación, hasta procesos relativamente simples y más económicos, como el compostaje o la digestión anaerobia. Por otra parte, cuando los residuos derivan de una recogida mixta, su destino final casi con toda probabilidad podría ser vertedero o incineración (Moreno & Moral, 2008).

Las principales ventajas y desventajas derivadas de los diferentes tratamientos se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2: Principales ventajas y desventajas derivadas de las distintas alternativas de tratamiento de residuos orgánicos.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Incineración controlada	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso común. - 85% de recuperación energética. - Reducción del volumen hasta un 10%. - Producción de energía para sustituir el uso de combustibles fósiles. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamiento para los gases costoso. - Generación de cenizas que terminan en vertedero. - Generación de NO_x y otros gases.
Pirólisis	<ul style="list-style-type: none"> - Retención de metales pesados. - Producción de menor cantidad de gas residual que la incineración. - Útil para residuos difíciles de tratar. - Producción de energía. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necesidad de trituración. - Elevados costes de tratamiento. - El residuo contiene 20-30% de poder calorífico. - Los aceites pirolíticos contienen componentes cancerígenos y tóxicos.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Gasificación	<ul style="list-style-type: none"> - Uso del residuo como fuente energética. - Producción de energía. - Mejor retención de metales pesados que otros tratamientos. - Genera menor cantidad de gas residual que la incineración. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere trituración. - Generación de NOx. - Baja implantación. - Elevados costes. - El residuo contiene 20-30% del poder calorífico.
Digestión anaerobia	<ul style="list-style-type: none"> - Obtención de energía. - Posible recuperación de nutrientes. - Minimización de olores. 	<ul style="list-style-type: none"> - Separación de residuos en la fuente. - Necesidad de tratamiento adicional la fracción sólida.
Compostaje	<ul style="list-style-type: none"> - Tecnología económica, eficaz y sencilla. - Eliminación de patógenos y semillas. - Posibilidad de controlar el proceso. - Obtención de un abono orgánico rico en nutrientes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Emisión de olores en el proceso si las condiciones no son adecuadas. - Necesaria separación en origen. - Pérdida de carbono del 40-60% en forma de CO₂.

Fuente: modificado de Estrella-González et al. (2020)

1.3. Compostaje

Entre los distintos tratamientos existentes para la reutilización de residuos lignocelulósicos, el compostaje puede considerarse como el más beneficioso desde el punto de vista ambiental y económico, básicamente cuando es aplicado en zonas donde existe una importante y creciente acumulación de este tipo de residuos (Guisado, 2008).

Justus von Liebig (1803-1873) fue un químico de origen alemán, considerado una de las primeras personas en estudiar minuciosamente el fenómeno de cómo los restos orgánicos se transformaban en abono para las plantas (Páez, 2021). Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que aporta esta estrategia de gestión, en 2016, en los Estados miembros de la Unión Europea (UE), tan solo 40 de un total de 2.500 millones de toneladas de residuos municipales, se utilizaron para producir compost. La mayor parte se incineró o almacenó junto con otros desechos (Jędrzak, 2018). En el intento de mitigar tales pérdidas, recientemente se ha publicado en BOE la Ley 7/2022, que menciona la obligación del productor de asegurar el tratamiento adecuado de sus residuos, y reciclar o recogerlos selectivamente para una correcta gestión de los mismos (Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular, 2022).

El compostaje es un método seguro y eficaz para el tratamiento de los restos orgánicos. Es un proceso aerobio, protagonizado por microorganismos, en el que se produce energía en forma de calor, agua y CO₂ (Figura 2). Al final del proceso se obtiene un producto humificado denominado compost, libre de agentes patógenos y semillas de malas hierbas. Además es posible la degradación de una amplia gama de contaminantes orgánicos (Obsa et al., 2022).

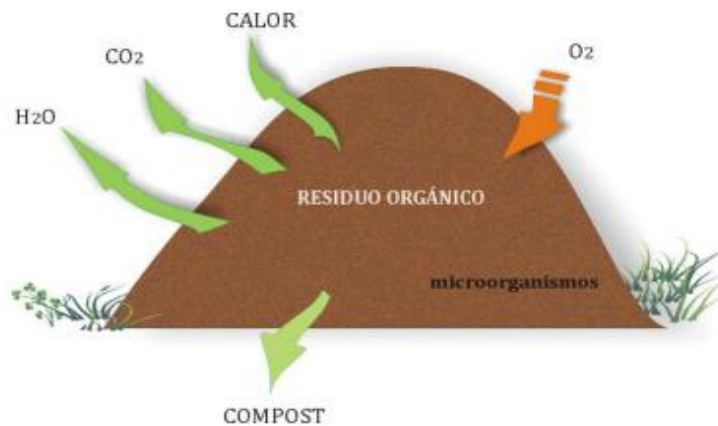


Figura 2: Esquema del proceso de compostaje. **Fuente:** Villar (2017).

Durante el compostaje se pueden observar cuatro fases (Figura 3), en función de las temperaturas predominantes en cada caso:

Fase I – Fase Mesofílica: También se conoce como fase de inicio en donde la temperatura comienza a elevarse por encima de la temperatura ambiente hasta llegar a los 40 °C (Páez, 2021).

Fase II – Fase Termofílica: Se inicia cuando la temperatura ha alcanzado los 40 °C y sigue aumentando hasta alcanzar valores de 60-70 °C. Después de llegar a un punto máximo, la temperatura comienza a disminuir debido a que el descenso en los niveles de nutrientes fácilmente disponibles, humedad y oxígeno pueden limitar la propia actividad microbiana (Páez, 2021). Cuando la temperatura empieza a decaer tras un pico en fase termófila, los materiales deben ser volteados para reactivar el proceso.

Fase III – Fase de Enfriamiento: comienza cuando la temperatura está disminuyendo por debajo de los 40 °C hasta alcanzar nuevamente los valores de temperatura ambiente, no detectándose reactivación de la fase termófila tras el volteo. Esta fase finaliza una vez que la temperatura del compostaje se iguala con la temperatura ambiente al menos durante tres días consecutivos (Páez, 2021).

Fase IV – Fase de maduración: durante esta fase se produce la estabilización y humificación de los materiales y se inicia una vez que finaliza la fase de enfriamiento, y la temperatura es similar a la ambiental. Esta fase puede durar de 2 a 6 meses (Páez, 2021).

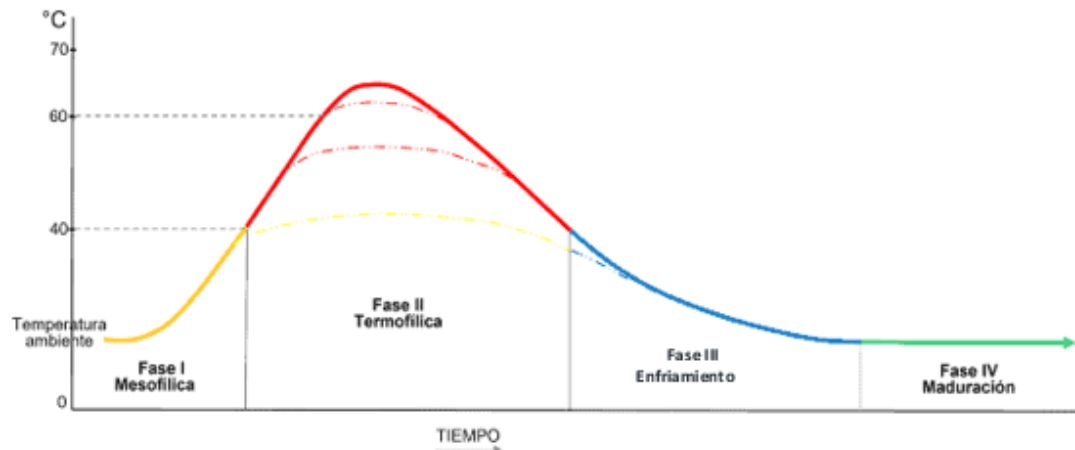


Figura 3: Fases térmicas del compostaje. **Fuente:** Páez (2021).

Entre las ventajas del compostaje destacan la disminución de la masa y el volumen de los materiales compostados a causa de la evaporación del agua y de la liberación de dióxido de carbono a partir de los procesos de degradación de la materia orgánica. También se obtiene una enmienda húmica rica en materia orgánica, compost (Foto 2), que puede aportar múltiples beneficios a nivel agronómico (Obsa et al., 2022). A pesar de estas ventajas, los residuos lignocelulósicos derivados de la agricultura intensiva, por sus propiedades físicas y químicas suponen un gran reto para la agroindustria sostenible, ya que la baja eficiencia del compostaje prolonga el tiempo total de finalización, y podría afectar a la calidad del producto final (Greff et al., 2022). Varios autores, proponen como alternativa, el co-compostaje con otro tipo de residuos, de forma que sea posible adecuar las características de las materias primas en relación al contenido en carbono, nitrógeno y materia orgánica, y obtener así productos de mayor calidad (Greff et al., 2022).



Foto 2: Compost utilizado como fertilizante. **Fuente:** García & Hernández (2018).

1.4. Bioconversión de biomasa lignocelulósica durante el compostaje

El compostaje es un proceso químico y biológico, durante el cual, en presencia de oxígeno, la biomasa lignocelulósica se transforma en sustancias de tipo húmico, similares al humus que se encuentra presente en suelos ricos en materia orgánica (Wu et al., 2022). Los componentes principales de las sustancias húmicas generadas durante el proceso de compostaje son los ácidos húmicos, solubles en base e insolubles en ácido, los ácidos fúlvicos, solubles en ácido o base, y las huminas, que son insolubles (Wu et al., 2022). Los ácidos húmicos tienen una estructura macromolecular aromática compleja con aminoácidos, péptidos, azúcares y compuestos alifáticos que participan en la unión entre grupos aromáticos. Su estructura contiene grupos OH fenólicos, estructuras quinónicas, nitrógeno y oxígeno, así como grupos COOH aromáticos (Figura 4) (Vázquez, 2013).

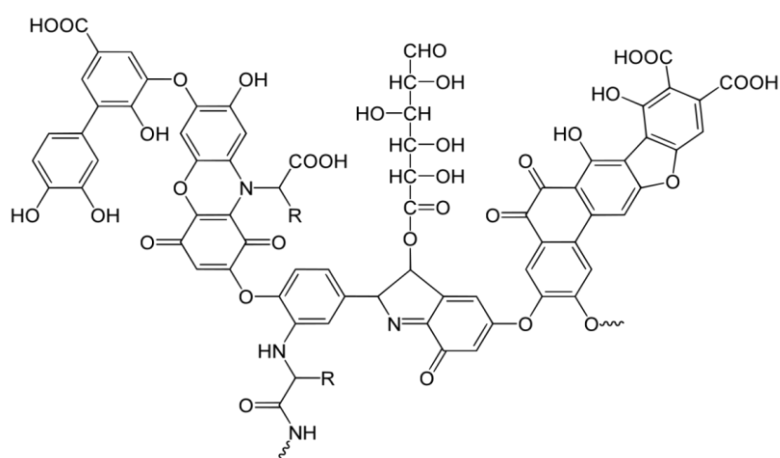


Figura 4: Estructura química - modelo de los ácidos húmicos. **Fuente:** Stevenson (1994).

Las teorías de la formación de sustancias húmicas en el suelo se basan principalmente en la teoría de la proteína-lignina, la teoría de la proteína-polifenol y la teoría de la síntesis microbiana (Wu et al., 2022). Generalmente se acepta que una combinación de estas teorías es la causa de la formación de precursores de las sustancias húmicas. Por un lado, la teoría de la lignina-proteína, se basa en que las sustancias húmicas son compuestos poliméricos formados de lignina y proteína (Wu et al., 2022). Por otra parte, la teoría de la proteína-polifenol radica en que algunos compuestos orgánicos (carbohidratos, lignina, etc.) se descomponen y transforman en derivados fenólicos, que luego se condensan con compuestos nitrogenados (proteínas simples, aminoácidos, péptidos, etc...). Finalmente, la teoría de la síntesis microbiana defiende que los microorganismos no solo descomponen la lignocelulosa para proporcionar sustratos para la síntesis de sustancias húmicas, sino que también producen precursores. Por lo tanto, los microorganismos tienen un efecto indiscutible en la formación de sustancias húmicas durante el compostaje (Wu et al., 2022). En parte, las tres teorías pueden complementarse entre sí, sin llegar a ser excluyentes (Figura 5) (Wu et al., 2022).

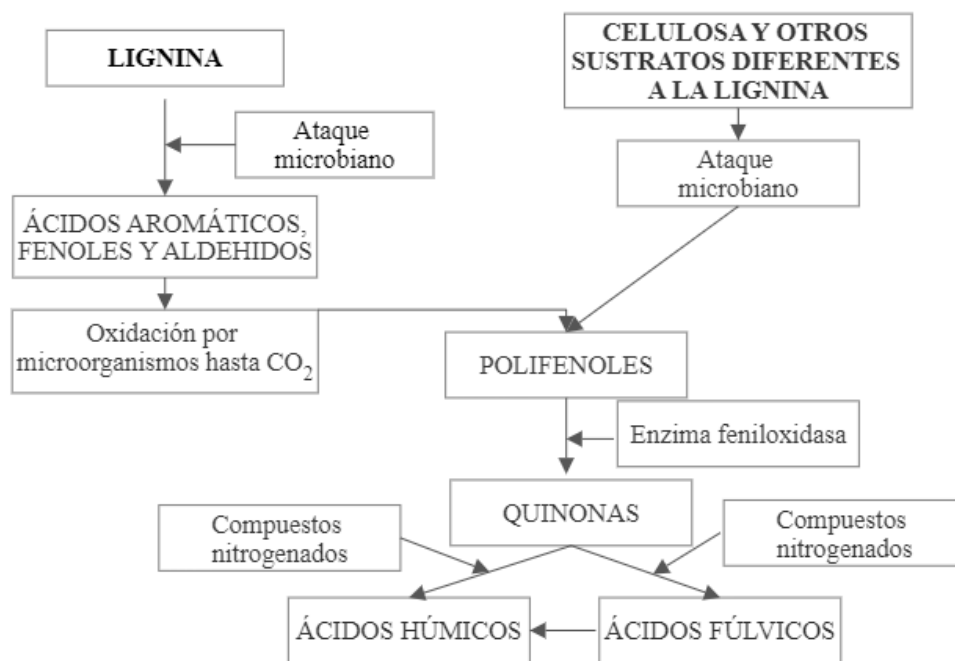


Figura 5: Teoría de los polifenoles en la formación de las sustancias húmicas. **Fuente:** Stevenson (1994).

Según defienden, por tanto, las distintas teorías de formación de humus, los precursores de sustancias húmicas (polifenoles, quinonas aromáticas y azúcares reductores) derivan todos de la degradación de restos lignocelulósicos (Wu et al., 2022). En este sentido, durante el proceso de compostaje de desechos lignocelulósicos, la lignocelulosa se degrada primero en diferentes tipos de productos (polifenoles, ácidos carboxílicos, aminoácidos y polisacáridos), que son importantes precursores de las sustancias húmicas (Wu et al., 2022). Al principio del proceso, antes de que se inicie la fase termófila, los microorganismos utilizan las sustancias más fácilmente disponibles, como los azúcares libres, los aminoácidos y los ácidos grasos, mientras que las sustancias refractarias, es decir, la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, comienzan a descomponerse en fase termófila. Durante esta fase se metaboliza la fracción más accesible de la lignocelulosa (Tuomela et al., 2000). Toda esta liberación de compuestos monoméricos simples permite que hongos, bacterias y actinomicetos termófilos dispongan de una fuente de nutrientes nuevamente disponible, para proliferar y mostrar una intensa actividad metabólica. La temperatura continúa ascendiendo hasta, aproximadamente, 65-70 °C. A esta temperatura, lignina y celulosa son débilmente degradadas, mientras que ceras, proteínas y hemicelulosas, continúan descomponiéndose rápidamente. Estos productos de hidrólisis se polimerizarán para formar sustancias húmicas en las fases de enfriamiento y maduración del compostaje (Wu et al., 2022).

1.5. Aplicación de inoculantes microbianos para la obtención de compost de calidad

Tanto el proceso de compostaje como la calidad del compost final pueden verse directamente influenciados por la inoculación con microorganismos lignocelulolíticos (Tabla 3).

Dicha inoculación puede dar lugar a variaciones en la actividad microbiana, la temperatura de las pilas, la relación C/N, y otros parámetros físico-químicos y biológicos del producto, incluido el contenido en fibras o en sustancias húmicas (Greff et al., 2022).

Tabla 3: Algunos géneros de bacterias y hongos utilizados como inoculantes en el proceso de compostaje.

Género/especie	Tipología	Fases predominantes
<i>Bacillus sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica y mesofílica
<i>Brevibacillus sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica y mesofílica
<i>Clostridium sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica y mesofílica
<i>Enterobacter sp.</i>	Bacteria Gram -	Termofílica y mesofílica
<i>Flavobacterium sp.</i>	Bacteria Gram -	Mesofílica
<i>Methylobacterium sp.</i>	Bacteria Gram -	Mesofílica
<i>Micromonospora sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica
<i>Nocardia sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica y mesofílica
<i>Paenibacillus sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica y mesofílica
<i>Pseudomonas sp.</i>	Bacteria Gram -	Mesofílica
<i>Serratia sp.</i>	Bacteria Gram -	Mesofílica
<i>Streptomyces sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica y mesofílica
<i>Thermoactinomyces sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica
<i>Thermopolyspora sp.</i>	Bacteria Gram +	Termofílica
<i>Thermus sp.</i>	Bacteria Gram -	Termofílica
<i>Acremonium sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Aspergillus sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hongos	Termofílica
<i>Chaetomium thermophile</i>	Hongos	Termofílica
<i>Coprinus sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Doratomyces sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Fusarium sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Gliocladium sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Humicola sp.</i>	Hongos	Termofílica y mesofílica
<i>Mortierella sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Mucor sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Paecilomyces sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Penicillium sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Scopulariopsis sp.</i>	Hongos	Mesofílica
<i>Talaromyces sp.</i>	Hongos	Termofílica
<i>Thermomyces sp.</i>	Hongos	Termofílica
<i>Trichoderma sp.</i>	Hongos	Termofílica

Fuente: Ryckeboer et al. (2003)

La utilización de inoculantes microbianos durante el compostaje tiene como objetivo principal, aunque no es el único, aumentar la población de microorganismos lignocelulolíticos, para mejorar la tasa de degradación de la materia orgánica. De hecho, se ha descrito que parte de la población de microorganismos autóctonos puede verse afectada por la contaminación química presente en los residuos de partida, y que deriva fundamentalmente de actividades antropogénicas (Fan et al., 2017). La bioaumentación con microorganismos lignocelulolíticos podría servir para mitigar dicho efecto. Otros estudios han revelado que la inoculación con microorganismos ligninolíticos acelera el proceso de compostaje al mejorar la degradación de la lignocelulosa (Wu et al., 2019).

La lignocelulosa (Figura 6) está compuesta por celulosa (35–50 %), hemicelulosa (20-30%) y lignina (25-35%). Debido a su compleja estructura es muy difícil de degradar, lo que la convierte en el principal factor limitante del proceso de compostaje, a la hora de alcanzar el grado óptimo de estabilidad y madurez del producto final (Xu et al., 2016).

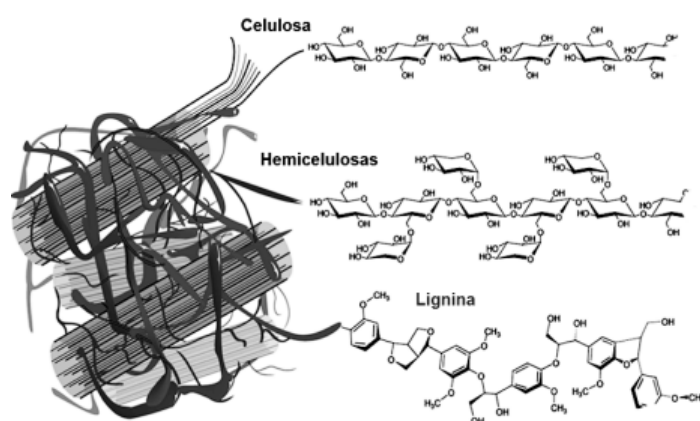


Figura 6: Componentes lignocelulósicos de la biomasa de restos vegetales. **Fuente:** Ramos & Gil (2017).

Aunque los tres polímeros tienen entidad propia, la asociación que existe entre ellos es tan elevada que, en la práctica, se puede considerar la existencia de una matriz compleja en la que se entrecruzan redes polisacáridicas de hemicelulosa, celulosa y lignina. Esta estrecha unión se debe a que la lignina es capaz de actuar como un factor de protección para las otras fracciones (Vanholme et al., 2010). Esta asociación intrincada dificulta el acceso a las enzimas implicadas en el proceso de biodegradación (Barrington et al., 2002). En comparación con la lignina, hemicelulosa y celulosa se degradan más fácilmente por la acción de bacterias y hongos (Hemati et al., 2018).

1.6. *Pretratamiento biológico de residuos orgánicos con microorganismos lignocelulolíticos*

Los residuos lignocelulósicos son la biomasa renovable más abundante en la tierra. Sin embargo, la presencia de lignina en la estructura de este biopolímero los convierte en altamente resistentes a la solubilización, lo que dificulta la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa. En este contexto, los microorganismos son funcionalmente muy versátiles, produciendo en ocasiones, potentes complejos enzimáticos que juegan un papel dominante en la conversión de la lignocelulosa (Zhang et al., 2021).

Un método de pretratamiento exitoso de los residuos vegetales debe dar como resultado la separación parcial o total de los componentes lignocelulósicos (Figura 7), aumentando la accesibilidad de la celulosa y hemicelulosa a la hidrólisis enzimática y liberando moléculas menos recalcitrantes que puedan ser degradadas posteriormente (Zhang et al., 2021).

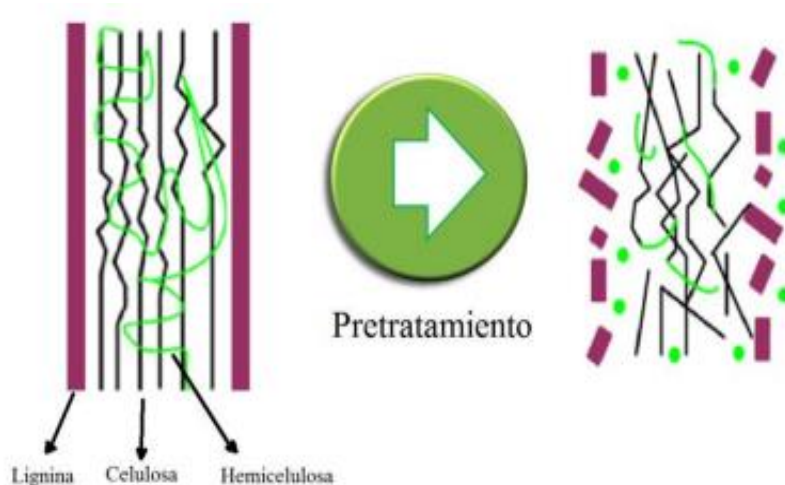


Figura 7: Biomasa lignocelulósica antes y después del pretratamiento. **Fuente:** tomado de Cortez (2013).

El pretratamiento biológico de restos vegetales de cara al proceso de compostaje, es una técnica prometedora ya que ocurre bajo condiciones moderadas de incubación, no se generan inhibidores, y es un procedimiento ecológico y de bajo coste, ya que los propios microorganismos tienen la capacidad de cambiar y acceder a la biomasa lignocelulósica (Zhang et al., 2021). El pretratamiento biológico de este tipo de residuos puede llevarse a cabo con cepas aisladas o bien con consorcios formados a base de bacterias y/u hongos lignocelulolíticos. Además, la degradación de la lignocelulosa se puede llevar a cabo directa o indirectamente, según las características selectivas de la lignocelulosa (Wu et al., 2022). A pesar de las ventajas del pretratamiento biológico de la lignocelulosa, existen una serie de inconvenientes relacionados con los largos tiempos de tratamiento y los requerimientos especiales de los microorganismos durante el proceso de descomposición (Wu et al., 2022).

Los hongos de la pudrición parda, blanca y blanda (Foto 3), poseen una gran capacidad para llevar a cabo la deslignificación de los restos vegetales. Pueden producir enzimas

extracelulares de tipo lacasa (Lac), lignina peroxidasa (LiP) o manganeso peroxidasa (MnP) (Wu et al., 2022).



Foto 3: Hongos de pudrición de la madera. **Fuente:** Anónimo (2020).

Los hongos de la podredumbre parda, dentro del grupo de los basidiomicetos, modifican la lignina de forma leve, de forma que los grupos hidroxilo y aril-metoxilo permanecen en la lignina (Wu et al., 2022). En contraste, los microorganismos degradadores más eficientes de lignina son los hongos de la pudrición blanca, pertenecientes al grupo basidiomicetos y ascomicetos. Estos pueden atacar la lignina de forma selectiva o bien mediante el efecto sinérgico de varias ligninasas y celulasas, además de catalizar la escisión enzimática de los anillos aromáticos de la lignina a través de procesos de oxidación (Wu et al., 2022).

El pretratamiento fúngico provoca una reducción significativa en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina del biopolímero (Suthar & Kishore Singh, 2022), pero se necesitan estrictas condiciones de producción de inóculo y de incubación, lo cual limita su aplicación industrial. En comparación con los hongos, sin embargo, las bacterias pueden tolerar rangos más amplios de pH, temperatura y oxígeno y son fáciles de manipular (Xu et al., 2018). Existen diversas investigaciones acerca de bacterias ligninolíticas, que pueden confirmar la inmensa adaptabilidad ambiental de este grupo microbiano (Xu et al., 2018). De este modo, se sabe que las enzimas ligninolíticas de origen bacteriano participan activamente en la degradación de fenoles, diaminas, aminas aromáticas y otras moléculas xenobióticas (Zhang et al., 2021).

Varios autores han reportado que la inoculación con actinobacterias termófilas en forma de consorcio microbiano mejora la degradación de la lignocelulosa (Wu et al., 2022). Un género bacteriano de interés en este sentido es *Bacillus*. Las especies de *Bacillus* son conocidas por su versatilidad enzimática, y su capacidad para resistir condiciones ambientales extremas y producir metabolitos secundarios y enzimas de enorme interés (Cariello et al., 2007).

Una gran diversidad de hemicelulasas bacterianas son también producidas y secretadas por miembros de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Chainia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Butyrivibrio*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Cellvibrio* y *Thermotoga* (Wang et al., 2019). Todos ellos podrían existir de forma simultánea en un entorno tan complejo como es el proceso de compostaje. Además, algunos microorganismos productores de xilanasas han sido aislados a partir de ambientes extremos, confirmándose la elevada estabilidad de estas enzimas a altas y bajas temperaturas, así como a pH alcalinos (Dalia et al., 2003; Sethi & Scharf, 2013). Por otra parte, algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Propionibacterium*, *Thermomonospora* y *Bacillus*, también han demostrado ser buenas productoras de lignina peroxidasas (LiP) (Rahman et al., 2013; Surabhi et al., 2018), lo que las convierte en excelentes herramientas biotecnológicas para el tratamiento de biomasa lignocelulósica.

2. Justificación y objetivos

Los restos vegetales procedentes de la agricultura intensiva son una rica fuente de biomasa lignocelulósica, cuya estructura molecular la convierte en un polímero altamente refractario y, por tanto, difícil de biodegradar. Por otro lado, durante el proceso de compostaje, los microorganismos son los protagonistas de la degradación y transformación de las fracciones orgánicas. Dicho potencial se basa en la capacidad de muchos de ellos para secretar cantidades significativas de enzimas lignocelulolíticas, que favorecen la hidrólisis del complejo biopolímero que es la lignocelulosa.

A la vista de lo expuesto en apartados previos, el pretratamiento biológico de biomasa lignocelulósica se muestra como un método eficaz para el tratamiento de restos agrícolas de distinta composición, teniendo en cuenta la enorme heterogeneidad de este tipo de materiales. De este modo, aprovechando además el conocimiento que se tiene en cuanto a la microbiota termotolerante presente en materiales compostados, se propone la inoculación con bacterias termorresistentes lignocelulolíticas, en etapas previas al inicio del proceso de compostaje. Dicha práctica podría acelerar los tiempos de degradación y humificación, y dar lugar a productos de mayor calidad sin necesidad de elevar los costes de producción.

Así, el presente Trabajo de Fin de Máster tuvo como **objetivo principal** evaluar el efecto de la aplicación de dos cepas termotolerantes y lignocelulolíticas de *Bacillus* spp. en etapas previas al proceso de compostaje, como agentes activadores de la degradabilidad de residuos vegetales procedentes de la agricultura intensiva.

Para la consecución del objetivo principal se desarrollaron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Establecimiento de un protocolo de acondicionamiento de residuos vegetales de forma previa a su inoculación con dos cepas de *Bacillus* spp. lignocelulolíticas.
- 2) Determinación del efecto de la inoculación con las dos cepas de *Bacillus* spp. lignocelulolíticas sobre la activación de la biodegradabilidad de los restos vegetales, en función del inóculo, de la dosis aplicada, y del tiempo de incubación previo al proceso de compostaje.

3. Materiales y métodos

Este apartado describe las herramientas metodológicas utilizadas en el desarrollo del presente estudio para abordar los objetivos previamente planteados.

3.1. Material vegetal

Se utilizaron restos de poda procedentes de jardines urbanos, y restos vegetales frescos exentos de fruto. En concreto se trabajó con restos de plantas de tomate procedentes de la agricultura intensiva de la Provincia de Almería. El material fue proporcionado por la empresa “Reciclados Almerienses 2005”, cuya actividad principal es la gestión de residuos vegetales y su tratamiento mediante compostaje. En la Tabla 4 se indican las características físico-químicas de las materias primas en el momento de su recepción en el laboratorio.

Tabla 4: Caracterización físico-química básica de las materias primas vegetales.

Materia prima	Densidad aparente (kg/m ³)	Humedad (%)	Carbono (%)	Nitrógeno (%)	Relación C/N
Restos vegetales	18	75	35,3	2,8	12,6
Restos de poda	47	7	29,3	0,8	36,25

3.2. Microorganismos

Las dos cepas utilizadas como inoculantes microbianos procedieron de la colección de cepas del Grupo de Investigación BIO-175, “Desarrollo de Técnicas Microbiológicas para la Mejora de Suelos de Interés Agrícola”, de la Universidad de Almería. Las cepas utilizadas fueron *Bacillus safensis* 190 y *Bacillus licheniformis* 1974 (Foto 4). Trabajos previos han confirmado la capacidad xilanasas y ligninasas de ambas cepas (López-González et al., 2014).

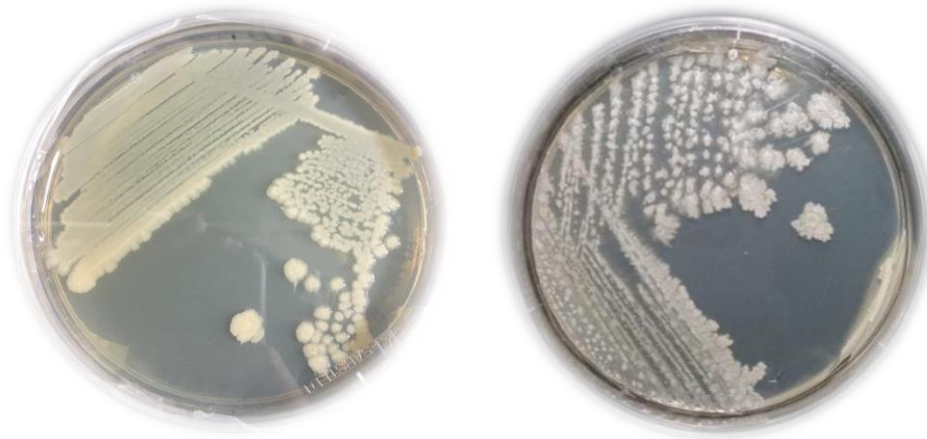


Foto 4: Microorganismos ligninolíticos, de izquierda a derecha: *Bacillus safensis* y *Bacillus licheniformis*.

El mantenimiento de ambas cepas se llevó a cabo en medio general APHA (Oxoid, ref. CM0463) a 4 °C hasta el momento de su utilización.

3.3. Medios de cultivo y reactivos

- Medio de cultivo APHA

Tanto el aislamiento y producción de inóculo, como el mantenimiento a corto-medio plazo de ambas cepas se llevó a cabo en medio APHA (Oxoid, ref. CM0463). La composición del medio APHA se indican en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición del medio de cultivo APHA.

APHA	
Extracto de levadura	2,5 g/L
D(+)-Glucosa (Anhidro)	1 g/L
Digerido Enzimático de Caseína	5 g/L
Agar Bacteriológico	15 g/L
Agua destilada	1 L
pH	7 ± 0,2

Para su preparación se pesaron 23,5 g del preparado comercial deshidratado y se mezcló con 1 L de agua destilada en un matraz de vidrio para, posteriormente esterilizarlo mediante autoclave a 121 °C y 1 atm de sobrepresión, durante 20 minutos. Tras ser autoclavado, el medio se vertió en placas Petri de 90 mm de diámetro, así como en placas cuadradas de 120 mm de lado, en condiciones de esterilidad. Estas placas se almacenaron en la cámara fría a 4 °C hasta el momento de su uso.

- Caldo Nutritivo (CN)

Para la obtención del preinóculo bacteriano se preparó Caldo Nutritivo (Panreac, ref. 413793.1210) (Tabla 6), en tubos de ensayo de 13 x 100 mm. Para ello se pesaron 8 g del preparado comercial y se disolvieron en un vaso de precipitados con 1 L de agua destilada. Una vez disuelto, el medio se repartió a razón de 5mL por tubo de ensayo. Los tubos se autoclavaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, y finalmente se conservaron en cámara fría a 4 °C hasta su posterior uso.

Tabla 6: Composición del Caldo Nutritivo.

CALDO NUTRITIVO	
Extracto de carne	3 g/L
Peptona de gelatina	5 g/L
Agua destilada	1 L
pH	6.8 ± 0,2

- Solución salina al 0,9%

Se preparó Solución salina (SS) a razón de 9 g de NaCl por litro de agua destilada. Ésta se utilizó para la recogida de biomasa bacteriana, así como para realizar las diluciones necesarias de forma previa a la obtención de la cuantificación de los inóculos.

- Reactivos utilizados para el análisis de fibras

Para determinar los porcentajes de lignina, celulosa y hemicelulosa en las mezclas inoculadas, se utilizaron tres tipos de detergentes. Para preparar el detergente neutro (Ankom, ref. FND20C) se adicionaron 10 ml de etil-glicol y 59,98 g de polvo de detergente neutro en 1 litro de agua destilada. Por otro lado, para la preparación del detergente ácido (Ankom, ref. FAD20C), se utilizó ácido sulfúrico 1N y 20 g de polvo de detergente ácido en un litro de agua destilada. Finalmente, para la preparación de la solución ácido de sulfúrico, se utilizó solo ácido sulfúrico 24N.

3.4. *Diseño Experimental*

El desarrollo experimental que se muestra en la Figura 8 describe el acondicionamiento de los materiales vegetales, la obtención de los inóculos para su posterior inoculación en las mezclas de partida a diferentes dosis, así como las condiciones de incubación de las muestras. Así mismo, se relacionan los parámetros analizados para evaluar el efecto de la inoculación microbiana sobre la biodegradación de la fracción lignocelulósica.

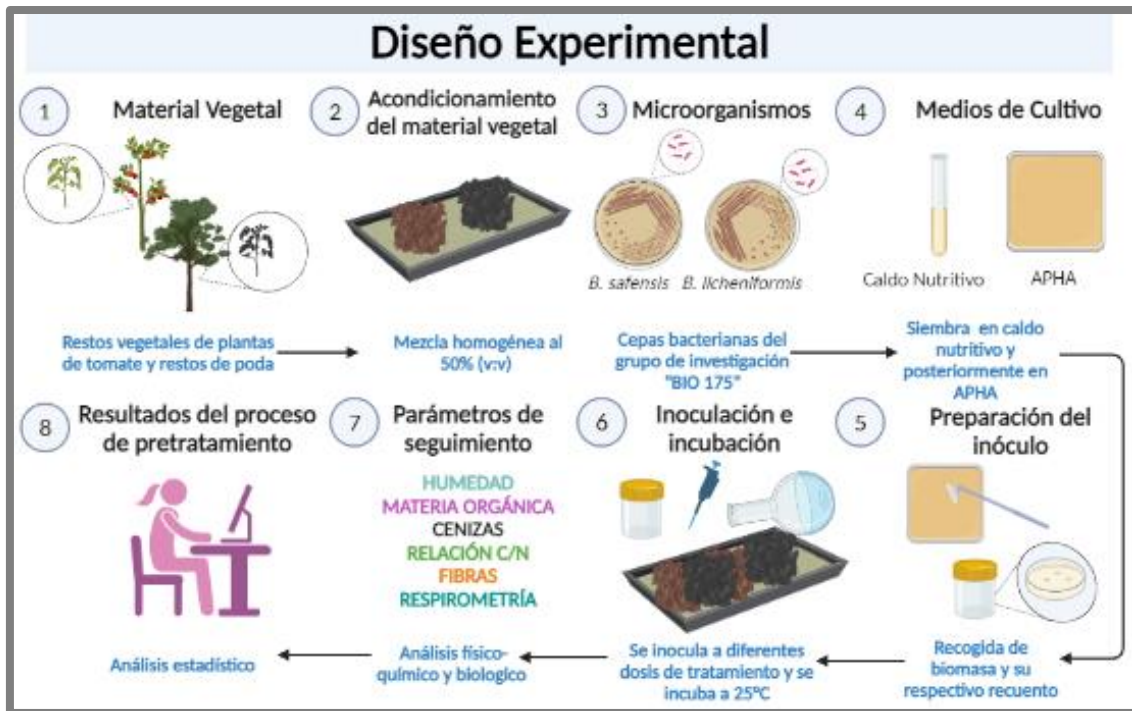


Figura 8: Diseño experimental.

3.5. Acondicionamiento del material vegetal de partida

Se utilizaron bandejas de plástico de 30 x 60 x 15 cm como reactores para llevar a cabo el tratamiento de los residuos con los inoculantes microbianos descritos previamente. Todas las bandejas se cubrieron con sus respectivas tapaderas perforadas, con el objeto de evitar problemas de condensación de agua. Los restos vegetales procedentes de poda y de agricultura intensiva fueron mezclados y homogeneizados en las bandejas, mezclados al 50% (v:v). Durante el acondicionamiento se retiraron plásticos y cualquier material o cuerpo extraño (Foto 5). El peso final de la mezcla de partida fue aproximadamente de 1 kg por bandeja.



Foto 5: De izquierda a derecha: residuos de poda y restos vegetales.

3.6. Preparación del inóculo

Para obtener el inóculo de ambas cepas, se procedió como se indica a continuación:

Pré-inóculo: a partir de cultivos puros de ambas cepas, *Bacillus safensis* y *Bacillus licheniformis*, se inocularon sendos tubos con 5 mL de CN, los cuales se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 24 h bajo condiciones de agitación a 110 rpm.

Siembra en masa: una vez obtenidos los pre-inóculos después del tiempo de incubación, se realizó una siembra en masa por extensión de ambas cepas, en placas cuadradas de 120 mm de lado con medio de cultivo APHA, utilizando un hisopo estéril. Las placas se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 24 h.

Recogida de Biomasa: tras la incubación, con la ayuda de una espátula estéril y humectando con SS al 0,9% las placas sembradas previamente, se recogió la biomasa correspondiente a cada cepa. Los inóculos obtenidos se agitaron vigorosamente con objeto de homogenizar las muestras y proceder a su respectivo recuento de Unidades formadores de colonias (UFC).

Recuento de UFC/mL: para la estimación del recuento bacteriano se aplicó el método de Miles et al. (1938). Se realizaron diluciones sucesivas para sembrarlas posteriormente en placa y, finalmente, llevar a cabo el recuento de UFCs en placa. Así, se consiguió obtener una densidad de inóculo de 10^8 y 10^7 UFC/mL para *Bacillus safensis* y *Bacillus licheniformis*, respectivamente. El esquema resumido correspondiente a la preparación de los inóculos se muestra en la Figura 9.

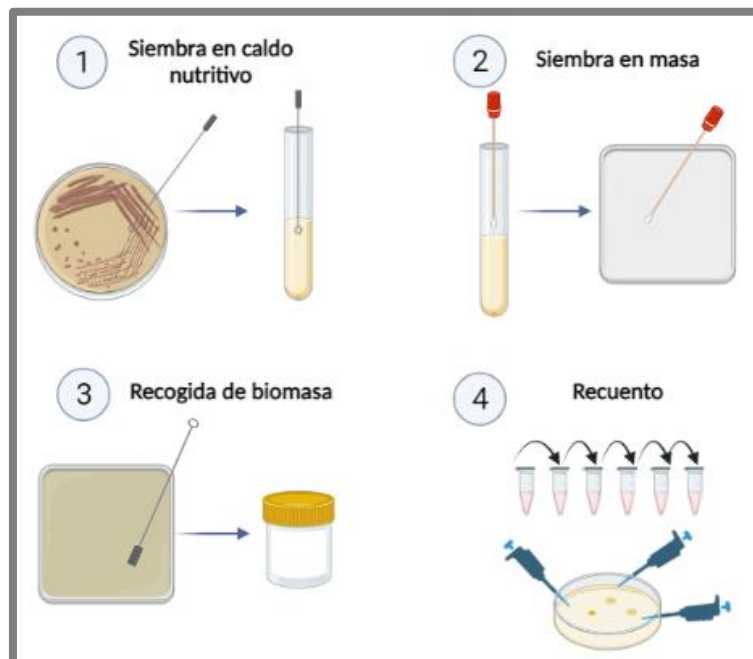


Figura 9: Obtención de los inóculos bacterianos.

3.7. Inoculación de la mezcla de materias primas y condiciones de incubación

La inoculación con ambas cepas se llevó a cabo de forma independiente, utilizando dos dosis de inóculo: Dosis Alta (10^6 UFC/g de residuo) y Dosis Baja (10^4 UFC/g de residuo). Así mismo, se establecieron tres tiempos de muestreo: 0, 10 y 30 días, contados a partir del día de la inoculación. Cada tratamiento de inoculación se llevó a cabo por triplicado, y se tuvo también en cuenta un bloque de muestras sin inocular, que sirvieron como control del proceso.

El inóculo se añadió a la mezcla de materias primas suspendido en el agua de humectación de los materiales, mediante aspersión. Por tanto, paralelamente a la inoculación, se ajustó la humedad de las muestras en torno al 65%. Finalmente, las bandejas se incubaron a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y en oscuridad, y se llevó a cabo el volteo manual de los materiales cada 48 h, con objeto de evitar problemas de anaerobiosis.



Foto 6: Incubación de las bandejas

3.8. Parámetros de seguimiento

La influencia de los inóculos bacterianos se midió en función de varios parámetros indicadores que, de forma directa o indirecta, permitieron llevar a cabo un rastreo de la activación de la biodegradación de la fracción lignocelulósica en las mezclas de partida. Tanto al inicio del ensayo de pretratamiento, como en posteriores muestreos a 10 y 30 días, se recogió material en bolsas plásticas tipo *zip* y se organizaron como se indica a continuación: 100 g de muestra se reservaron para análisis respirométrico y otros 100 g para determinar la humedad. Tras el cálculo de humedad, las muestras secas se trituraron para obtener un tamaño de partícula de 1 mm (Foto 7), y se aprovecharon para realizar el análisis de materia orgánica,

relación C/N y fibras (celulosa, hemicelulosa y lignina). El material vegetal sobrante de cada bandeja se almacenó a -20 °C.



Foto 7: Muestras secas y trituradas.

3.8.1. Humedad, Materia Orgánica y Cenizas

Para realizar el análisis de humedad se pesaron 100 g de muestra fresca en vaso de cristal y se introdujeron en un horno Pasteur (Selecta Conterm, COD: 2000210, J.P. Selecta S.A., Abrera, Barcelona, España) durante 24 h a 120 °C. Posteriormente, se pesó la muestra seca y por diferencia de pesos se obtuvo el porcentaje de humedad. La fórmula aplicada fue:

$$\% \text{ Humedad} = (M_1 - M_2) * 100 / M$$

Donde:

M_1 = peso del vaso más muestra húmeda

M_2 = peso del vaso más muestra seca

M = peso de la muestra

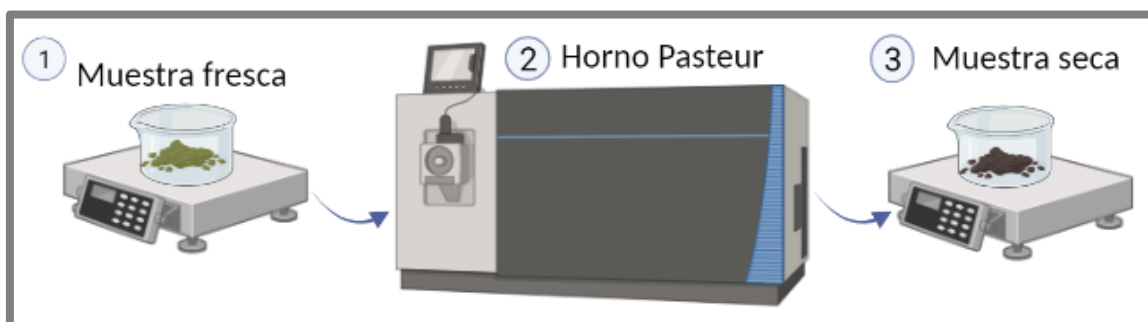


Figura 10: Representación gráfica del protocolo para calcular la humedad de las muestras.

Respecto al análisis de Materia Orgánica, se utilizó el método de Kakezawa et al. (1992). Se utilizaron crisoles previamente desecados en horno Pasteur durante 30 min a 120 °C.

Posteriormente se pesó 1 g de muestra seca y triturada en los crisoles tarados y se introdujeron en un horno de Mufla Hobersal HK-11 (Hobersal Furnaces & Ovens Technology, Caldes de Montbui, Barcelona, España) durante 3h 30 min a 550 °C. Finalmente se pesaron las muestras calcinadas y se estableció el porcentaje de cenizas de la muestra. Los resultados del porcentaje de cenizas de las muestras se determinaron por la siguiente expresión:

$$\text{Cenizas (\%)} = \text{Peso muestra no calcinada (g)} / \text{Peso muestra inicial (g)} \times 100.$$

Por tanto, el valor de la materia orgánica será:

$$\text{MO (\%)} = 100 - \text{Cenizas (\%)}.$$

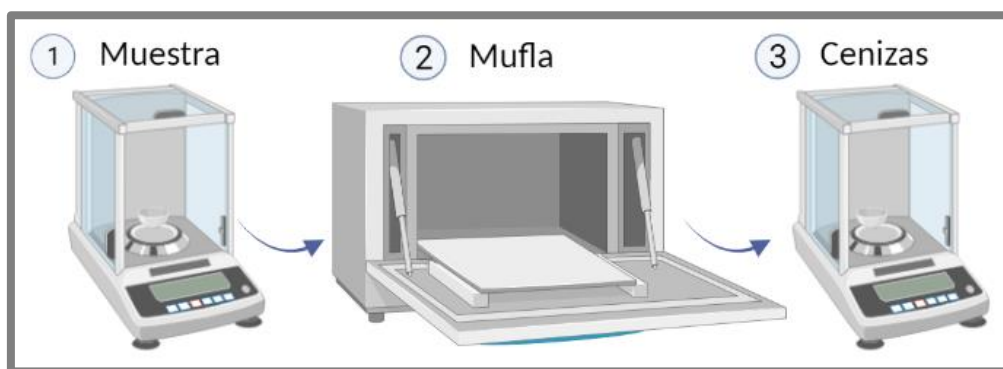


Figura 11: Representación gráfica del protocolo para obtener el peso de cenizas y materia orgánica

3.8.2. Relación C/N

El análisis de Carbono y Nitrógeno elementales se llevó a cabo en los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería. Las muestras se proporcionaron secas y trituradas, tal y como se describe en apartados previos. El protocolo utilizado fue el de combustión total de la muestra a altas temperatura (1200 °C), utilizando un analizador de elementales LecoTruSpec (Leco Co., St. Joseph, MI, USA). Tras obtener los resultados del % de Carbono y Nitrógeno a partir de las distintas muestras, se calculó la Relación C/N.

3.8.3. Análisis Respirométrico: Índice Respirométrico Acumulado (AT_4)

El equipo utilizado para llevar a cabo el análisis respirométrico (Foto 8) constó de 6 biorreactores, un sistema de 6 caudalímetros, y 6 sensores de oxígeno (Alphasense Ltd., Essex. CM77 7AA UK). Gracias a un software diseñado "ad hoc", se pudo calcular el oxígeno consumido en cada muestra, e indirectamente la actividad microbiana, tras la aplicación del protocolo que se describe a continuación.



Foto 8: Respirómetro con los reactores montados.

Para analizar la biodegradabilidad de las muestras, se utilizó la metodología descrita por Barrena et al. (2009) y Ponsá et al. (2010). Se pesaron 100 g de material fresco, y se introdujeron en reactores cerrados de PVC de 30 × 10 cm, de 1 L de capacidad, en cuya base se disponía una red metálica de 2 mm de diámetro de poro, que servía como soporte del material y para facilitar una distribución adecuada de aire en el interior del reactor. Este sistema se encontraba sumergido en agua a 37 °C de forma continuada.

Para la determinación del consumo de oxígeno en el equipo, la humedad de las muestras debía ajustarse entre un 40 y 65 % de humedad. El tiempo de incubación de las muestras fue de 4 días, siendo el caudal de oxígeno aplicado mediante un controlador de flujo (Bronkhorst Hitec, Países Bajos) de 15 mL/min. El consumo de oxígeno se determinó mediante la medida del Índice Respirométrico acumulado a los 4 días (AT_4). AT_4 (Aerobic Cumulative Index) es la cantidad acumulada de consumo de oxígeno durante 4 días completos. Este parámetro se expresó como g de oxígeno consumido por kg de materia orgánica ($g O_2 Kg^{-1} MO h^{-1}$). El esquema resumido correspondiente al análisis respirométrico se muestra en la Figura 12.

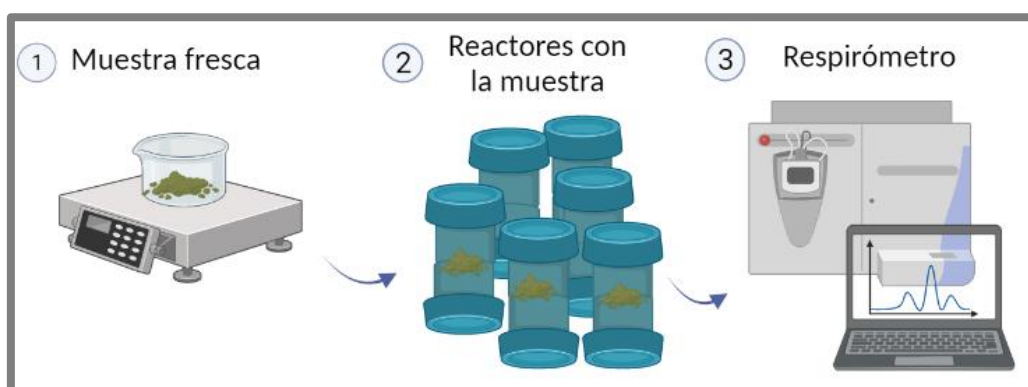


Figura 12: Representación gráfica del protocolo para llevar a cabo el análisis respirométrico

3.8.4. *Análisis de fibras: contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina y tasas de degradación*

El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina a partir de las mezclas inoculadas se determinó según el método descrito por “ANKOM Technology” (Foto 9).

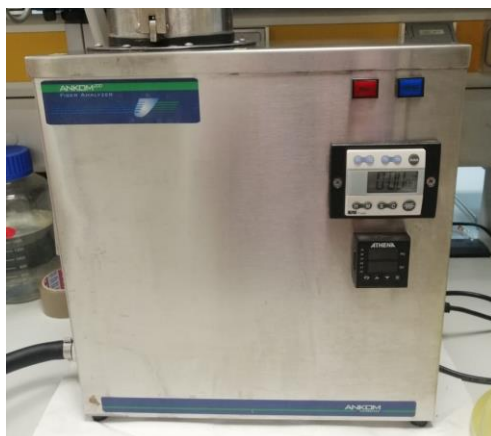


Foto 9: Digestor ANKOM utilizado en el proceso de análisis de fibras (ANKON TECHNOLOGY 200/220, Ankom Technology, Macedonia, NY, USA).

Inicialmente en el digestor, se colocaron un total de 24 bolsas sobre un suspensor que, a su vez, fue introducido en la cubeta de digestión del analizador con el detergente neutro (Ankom, ref. FND20C), 10 g de sulfito sódico y 2 ml de solución de alfa-amilasa. El material de las bolsas era poliéster libre de nitrógeno y cenizas. Las bolsas se llenaron con 0,5 g de muestra previamente seca y molida y fueron selladas con calor.

Tras dejar procesar las muestras en el digestor durante 75 minutos con agitación y calefacción, se realizaron 3 lavados con agua destilada a ebullición, los dos primeros con agua y 2 mL de alfa-amilasa, y un tercero solo con agua durante 5 minutos. A continuación, se retiraron las bolsas del digestor y durante 5 minutos se sumergieron en acetona bajo la campana extractora de gases. Pasado el tiempo indicado se retiraron y se dejó evaporar la acetona para secar las bolsas completamente en el horno Pasteur a 100 °C. Posteriormente, las mismas bolsas fueron sometidas a un tratamiento con detergente ácido (Ankom, ref. FAD20C) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados solo con agua destilada caliente durante 5 minutos. En una tercera fase, las bolsas fueron sometidas a un tratamiento con ácido sulfúrico durante 3 horas, tiempo tras el cual se aclararon con agua caliente y fría hasta alcanzar un pH neutro. Finalmente, una vez secas las bolsas, se pesaron y se incineraron en un horno mufla a 550 °C durante 3 h y media, para determinar el contenido en cenizas. Este proceso se repite para todas las muestras derivadas del ensayo de inoculación (Figura 13).



Figura 13: Representación gráfica simplificada del protocolo de análisis de fibras

El detergente neutro (FND) deja un residuo compuesto por las tres fracciones, celulosa, hemicelulosa y lignina. El detergente ácido (FAD) deja las fracciones correspondientes a celulosa y lignina, mientras que el ácido sulfúrico concentrado (LAD) permite conocer el contenido en lignina. De modo que:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FND} - \% \text{ FAD}$$

$$\% \text{ Celulosa} = \% \text{ FAD} - \% \text{ LAD};$$

$$\% \text{ Lignina} = \% \text{ LAD}$$

La tasa de biodegradación de celulosa, hemicelulosa y lignina se calculó según la fórmula de Wang et al. (2011):

$$\text{TB} (\%) = [(m_0 - m_n) / m_0] \times 100,$$

Donde:

TB: es la tasa de biodegradación (%) en un determinado muestreo (n).

m_n : contenido de la fracción lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa o lignina), para un determinado muestreo (n).

m_0 : contenido inicial de la fracción lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa o lignina).

3.9. Análisis estadístico

Los resultados, tablas y gráficas fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows. Los datos obtenidos se sometieron a análisis estadístico utilizando Statgraphics Centurion XVIII. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple (Test LSD de Fisher, de la mínima diferencia significativa) para establecer diferencias entre los distintos niveles de los factores analizadas ($p < 0,05$). Así mismo, se incluyó un Análisis de Funciones Discriminantes con objeto de agrupar los resultados de estudio en función del tratamiento aplicado.

4. Resultados y discusión

De acuerdo con los objetivos y diseño experimental propuestos, a continuación, se exponen los resultados obtenidos.

4.1. Influencia del pretratamiento biológico sobre el porcentaje de Humedad, Materia Orgánica y Cenizas

4.1.1. Humedad

Al inicio del pretratamiento las mezclas mostraron una humedad superior a la esperada, en torno al 75% (Gráfico 3). Este valor puede considerarse casi limitante a la hora de llevarse a cabo un proceso óptimo de biodegradación aerobia de la materia orgánica. Según Márquez & Blanco (2018), durante el proceso de compostaje la humedad óptima para que los microorganismos aerobios se desarrollen de forma adecuada oscila en torno al 50-70%. Humedades excesivamente elevadas pueden ocasionar problemas de anaerobiosis, ya que el agua desplaza al aire en los espacios libres existentes entre las partículas, reduciendo la transferencia de oxígeno. En cambio, cuando el porcentaje es menor al 30%, la actividad biológica puede descender de forma significativa. En este trabajo, a pesar de que los valores de humedad fueron elevados al inicio del proceso, no se detectaron problemas de anaerobiosis. La humedad inicial fue descendiendo progresivamente durante el tiempo de incubación de las muestras, aunque en ningún caso estuvo por debajo del 55% (Gráfico 3).

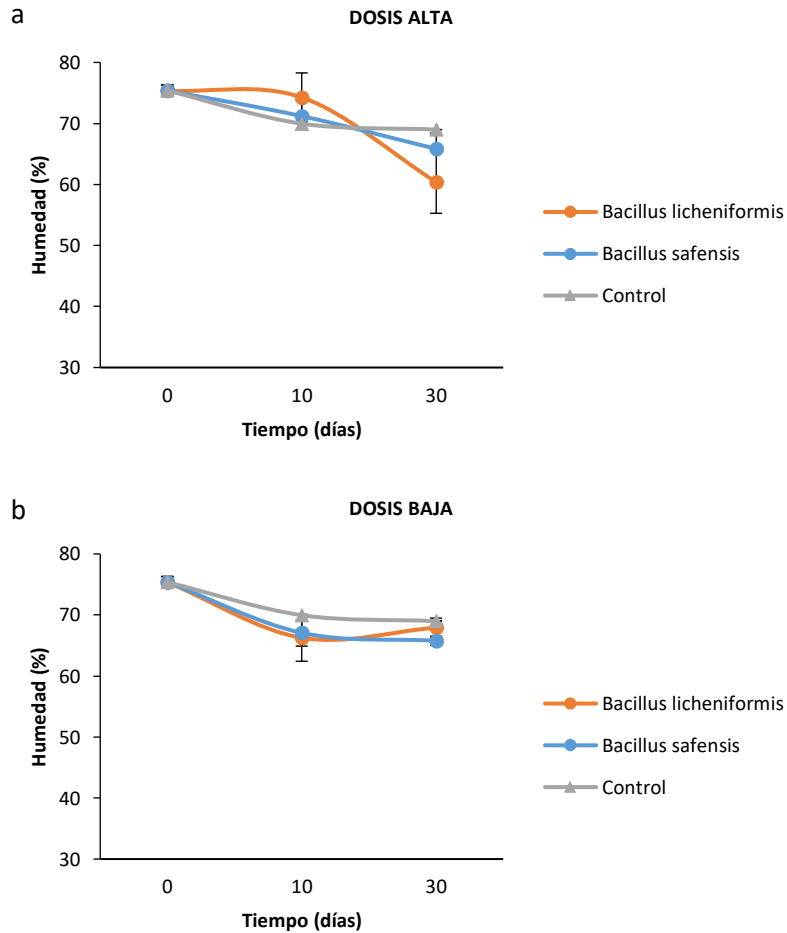


Gráfico 3: Representación del % de Humedad en relación con el tiempo de tratamiento: a) dosis alta y b) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular.

Aunque no se detectaron diferencias significativas entre Dosis, si se pudo detectar un descenso más pronunciado de la humedad en el caso de las mezclas inoculadas con *B. licheniformis* a Dosis Alta, después de 30 días de incubación (Gráfico 3a), lo que puede ser indicativo de una mayor actividad microbiana en las mezclas inoculadas con dicha cepa. La inoculación de los restos vegetales con *B. safensis* y *B. licheniformis* a una Dosis Baja (Gráfico 3b) dio lugar a un descenso de la humedad muy similar en ambos casos, reduciéndose ésta hasta el 66%, después de 10 días de tratamiento, es decir un 4% menos que lo observado en el control sin inocular.

De forma puntual, tanto a Dosis Alta como Baja, se detectaron pequeños incrementos en el contenido de agua de las muestras, lo que podría deberse a la liberación de agua metabólica por parte de microorganismos que descomponen la materia orgánica en presencia de oxígeno (Azim et al., 2018). Aun así, a la vista de los resultados descritos, se puede intuir que el contenido en humedad de las muestras pretratadas se mantiene en un rango adecuado para el desarrollo de microorganismos aerobios, hasta después de 30 días desde el momento de la inoculación. Aunque no se establecieron diferencias significativas entre dosis, la inoculación con

dosis más bajas reveló una activación de la degradación de los materiales algo más intensa durante los 10 primeros días de incubación.

El análisis de la interacción entre los factores Tiempo x Inóculo reveló de forma global que, a partir de los 10 días de incubación, el descenso de la humedad fue más notable en mezclas de residuos previamente inoculadas (Gráfico 4), lo que puede ser indicativo de una actividad biológica más intensa en relación con lo observado en el control.

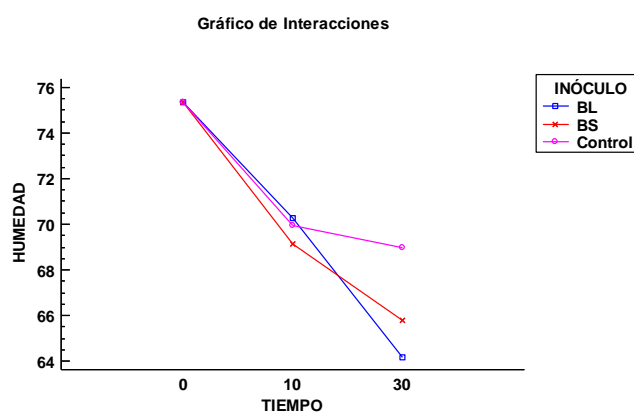


Gráfico 4: Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo x Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre el contenido en Humedad (BL: *B. licheniformis*; BS: *B. safensis*).

4.1.2. Materia Orgánica y Cenizas

Dado que el compostaje se define como un proceso de transformación aerobia de la materia orgánica bajo condiciones controladas (Moreno & Moral, 2008), resultó de especial relevancia controlar este parámetro desde el inicio de la fase de pretratamiento. La materia orgánica presente en una mezcla compuesta por restos lignocelulósicos va a estar sometida a numerosos procesos de biotransformación protagonizados por microorganismos (Antizar-Ladislao et al., 2006). Al inicio del ensayo de pretratamiento, se espera una rápida disminución de los carbohidratos. Las cadenas carbonadas más cortas pueden transformarse en compuestos más simples o, por el contrario, pueden reagruparse y formar moléculas más complejas. Tras el consumo de los compuestos lábiles, otros materiales más resistentes comienzan a degradarse lentamente en etapas posteriores, constituyendo el núcleo de los compuestos húmicos, junto a productos de degradación de la etapa anterior (Tomati et al., 2000; Castaldi et al., 2005). A pesar de que el ensayo de pretratamiento no puede asemejarse del todo a un proceso de compostaje, las reacciones que ocurren sobre el componente orgánico de las mezclas pueden ser muy similares durante las primeras fases.

En los Gráficos 5a y 5b se evidenció un elevado contenido en materia orgánica en las mezclas de partida, en torno al 75-80%. Dicho valor fue disminuyendo gradualmente hasta alcanzar valores cercanos al 60-65% después de 30 días de tratamiento. En términos generales, el descenso del contenido en materia orgánica fue más brusco en aquellas mezclas inoculadas con ambos inoculantes en comparación con el control, sobre todo cuando éstos fueron inoculados a dosis altas, y después de 10 días de incubación (Gráfico 5a). Este hecho revela que los inoculantes microbianos provocan un notable efecto de activación de la degradación de las mezclas, hecho que pudo comprobarse desde las primeras fases del ensayo.

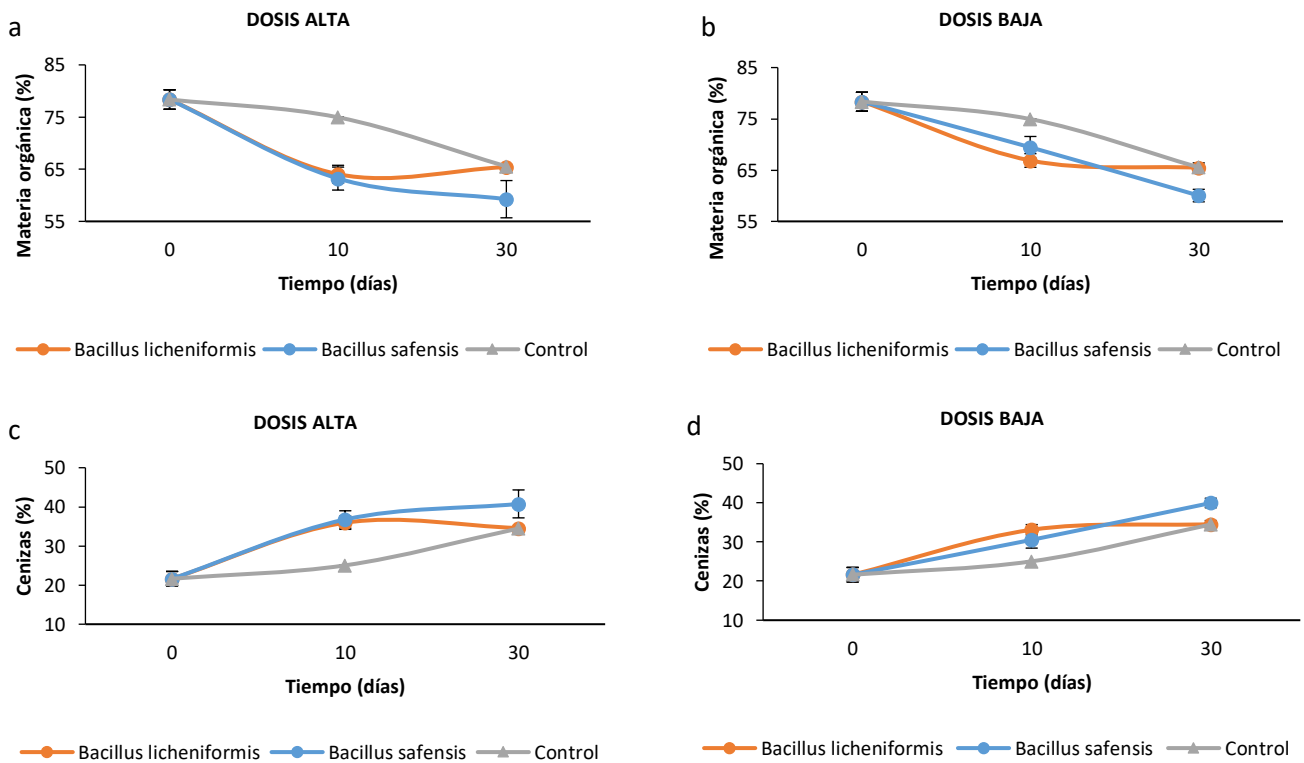


Gráfico 5: Representación del % de Materia Orgánica y % de Cenizas en relación con el tiempo de tratamiento: a) y c) dosis alta; b) y d) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular.

Siendo el objetivo de este trabajo la implantación de un protocolo de tratamiento biológico previo al compostaje, eficaz y de bajo coste, no parecería lógico que se tuviera que alargar más allá de 10 días, o que tuvieran que aplicarse condiciones de incubación que encarecieran el proceso. En cualquier caso, según indican Antizar-Ladislao et al. (2006), a temperaturas elevadas, la degradación de la materia orgánica puede reducirse debido a que se puede ver afectado el crecimiento microbiano. En este trabajo, se puso especial atención en que la temperatura de las mezclas no se incrementara; de hecho, durante todo el tiempo de incubación la temperatura fue similar a la ambiental.

Los Gráficos 5c y 5d muestran la evolución del contenido de cenizas en las muestras analizadas, lo cual se relaciona indirectamente con el contenido en materia orgánica, y directamente con el grado de mineralización de las muestras. Dicha mineralización fue significativamente superior en el caso de las mezclas inoculadas con ambas cepas, después de 10 días de tratamiento, en relación a lo observado en el control.

Aunque la dosis de inóculo utilizado no influyó globalmente en los resultados relacionados con el contenido en materia orgánica de las muestras, si se pudo detectar la influencia de la interacción entre los factores Tiempo x Inóculo (Gráfico 6). En términos generales, el uso de ambos inoculantes provocó un descenso brusco del contenido en materia orgánica, sobre todo después de 10 días de incubación. El descenso del contenido en materia orgánica fue especialmente relevante en las muestras inoculada con *B. safensis*.

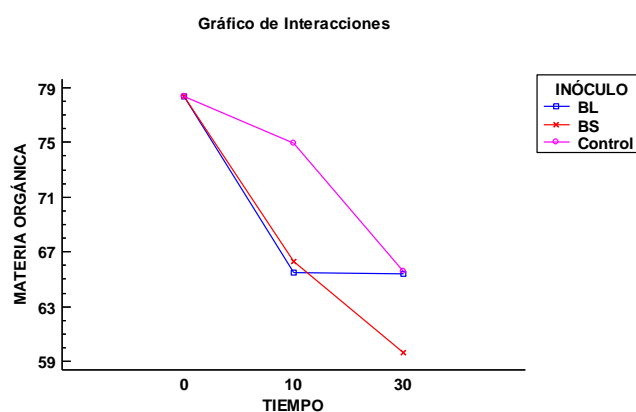


Gráfico 6: Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo x Inóculo, a un intervalo de confianza del 95 %, sobre el contenido en Materia Orgánica (BL: *B. licheniformis*; BS: *B. safensis*).

4.2. Relación C/N

Según Azim et al. (2018), las proporciones C/N adecuadas para que se desarrolle de forma óptima un proceso de compostaje varían entre 25 y 30. Si el valor de la relación C/N inicial es superior a 35, la actividad biológica se reduce, mientras que valores excesivamente bajos propician pérdidas de nitrógeno en forma de amoníaco, lo que podría, además, derivar en la emisión de olores desagradables, así como en productos finales pobres en nitrógeno. Teniendo en cuenta ambos criterios, la implantación de un protocolo de tratamiento biológico de forma previa al proceso de compostaje debería tener en cuenta que los niveles de C/N no deberían disminuir en exceso, ya que este hecho podría poner en riesgo la puesta en marcha de la fase biooxidativa del propio proceso.

En este trabajo, los valores iniciales de relación C/N oscilaron en torno a 24. Los resultados derivados del ensayo de pretratamiento, revelaron un descenso gradual y suave de este parámetro en las muestras inoculadas durante los 30 días de incubación. Dicho efecto se pudo observar en los mismos términos, independientemente de las dosis de inóculo aplicadas (Gráfico 7), de forma que los valores de C/N detectados al final del ensayo, oscilaron en un rango aproximado de 18 a 20.

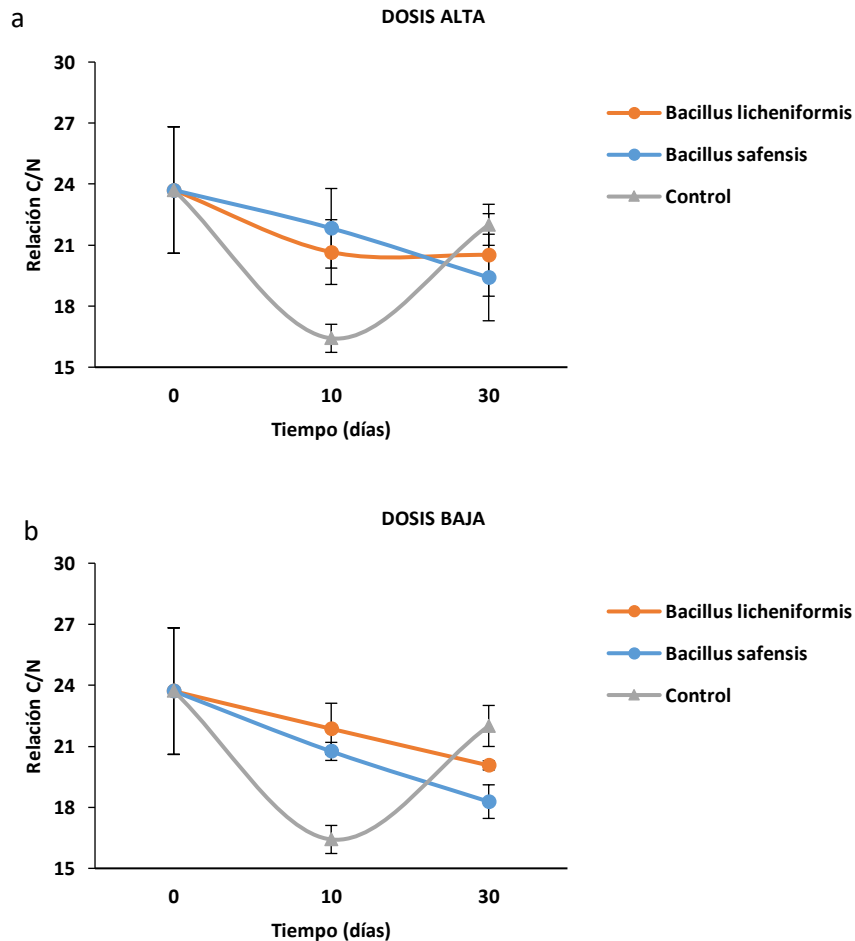


Gráfico 7: Representación de la Relación Carbono/Nitrógeno en relación con el tiempo de tratamiento: a) dosis alta y b) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular.

A la vista de lo observado en el Gráfico 7, cabe destacar el comportamiento diferente de las mezclas inoculadas con respecto a los controles sin inocular. En este último caso, se observó un descenso brusco de la relación C/N a los 10 días, alcanzando valores por debajo de 18, lo que podría ser contraproducente. En este sentido, Mustin (1987) comprobó que el tiempo de compostaje se incrementa cuanto mayor es la relación C/N inicial. Sin embargo, según Moreno & Moral (2008), si los residuos que van a ser compostados poseen una relación C/N inferior a 18-19, como es el caso de las muestras control a los 10 días (Gráfico 7), el compostaje se llevará a cabo con mayor rapidez, pero se perderá nitrógeno en forma de amoníaco. Estas

pérdidas pueden afectar a la calidad fertilizante del producto final, y suponen un problema ambiental, ya que el amoníaco es un gas con un considerable efecto invernadero. Por tanto, la implantación de un protocolo de tratamiento biológico previo al compostaje, debe tener en cuenta que la reducción de la relación C/N provocada en las mezclas tratadas no comprometa la puesta en marcha del proceso *a posteriori* (Azim et al., 2018).

Cabe mencionar, además que, en las muestras no tratadas la evolución de la relación C/N es más irregular, descendiendo bruscamente a los 10 días de iniciarse el ensayo, para luego volver a incrementarse hasta valores similares a los de inicio (Gráfico 7). Según indican Iglesias-Jiménez et al. (2008), este fenómeno podría explicarse en base a una disminución de la actividad biológica de las mezclas, lo que se refleja en un incremento en la relación C/N, hecho que no ocurre en las muestras tratadas con ambos inóculos. A pesar de que, de forma independiente, los factores Dosis e Inóculo no influyeron significativamente sobre los valores de relación C/N, dicho parámetro si se vio afectado por la interacción entre los factores Tiempo x Inoculo (Gráfico 8). En este caso, se pudo confirmar, con carácter general, las ventajas de los pretratamientos biológicos en relación a lo observado en los controles no inoculados.

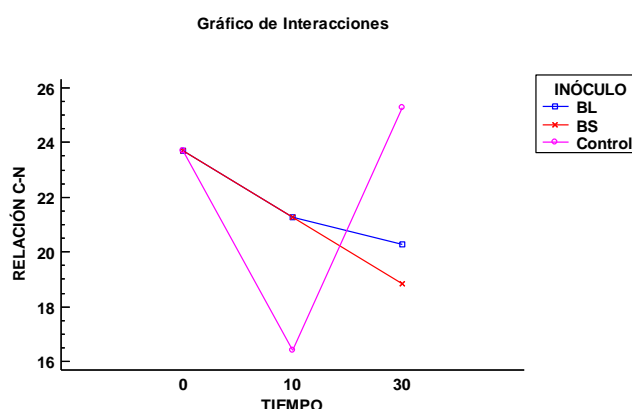


Gráfico 8: Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo x Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre la relación C/N (BL: *B. licheniformis*; BS: *B. safensis*).

4.3. Análisis respirométrico

Las medidas de respiración se basan principalmente en la cuantificación de la actividad biológica en un determinado sustrato. Los estudios respirométricos tradicionales hacen referencia al nivel de actividad microbiana en términos de consumo de oxígeno y en función del tiempo. Cuando se intensifica la actividad microbiana sobre un sustrato considerado como biodegradable, se genera una fuerte demanda de oxígeno y elevadas tasas de producción de dióxido de carbono. Por esta razón, la tasa de consumo de O₂ durante el compostaje podría ser

indicativa del estado, más o menos avanzado, en que se encuentra el proceso (Hue & Liu, 1995). En este sentido, las mezclas de partida en un proceso de compostaje se caracterizan por una elevada tasa de demanda de O₂ y producción de CO₂, en comparación con lo observado en mezclas poco biodegradables, o en compost maduros, más estables y menos activos (Azim et al., 2018).

En relación a lo mencionado anteriormente, cabe pensar que el tratamiento biológico de las mezclas de forma previa al proceso de compostaje podría servir para incrementar la biodegradabilidad de los materiales en relación con otras mezclas no inoculadas. De este modo, en el Gráfico 9, cabe destacar que la inoculación con ambas cepas dio lugar a perfiles de AT₄ diferentes a lo largo del tiempo de incubación. Así, la inoculación con *B. safensis* a Dosis Altas, dio lugar a valores de AT₄ superiores a lo observado para el resto de tratamientos, después de 10 días de incubación (Gráfico 9a); mientras que *B. licheniformis* inoculado a Dosis más bajas, fue capaz de mantener los valores de AT₄ más elevados a los 10 días, en comparación con lo observado en el resto de muestras analizadas (Gráfico 9b). En cualquier caso, después de 30 días, las muestras inoculadas con ambas cepas a Dosis Baja, mostraron valores de AT₄ similares y superiores a los observados en las muestras sin inocular (Gráfico 9b).

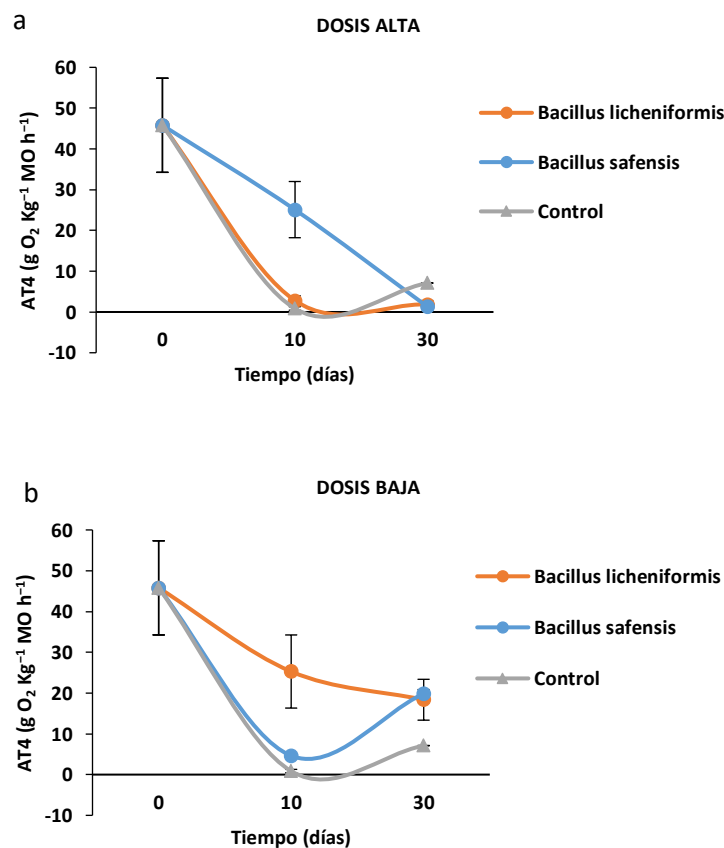


Gráfico 9: Representación de los valores de AT₄ en relación con el tiempo de tratamiento. a) dosis alta y b) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular. AT₄: Índice Respirométrico Acumulado a 4 días.

El análisis estadístico de los resultados derivados de estudio respirométrico no reveló una clara influencia de la Dosis de inóculo, aunque si se observó que la aplicación de dosis más bajas de inóculo podrían mostrar globalmente valores de AT₄ ligeramente superiores, después de 30 días de incubación (Gráfico 9b). Por otra parte, cabe destacar la influencia significativa de la interacción entre los factores Tiempo x Inóculo (Gráfico 10) confirmándose, en este caso, que la inoculación con *B. safensis* y *B. licheniformis* influyó positivamente sobre la biodegradabilidad de las mezclas, en función a lo observado en los controle sin inocular (Gráfico 10).

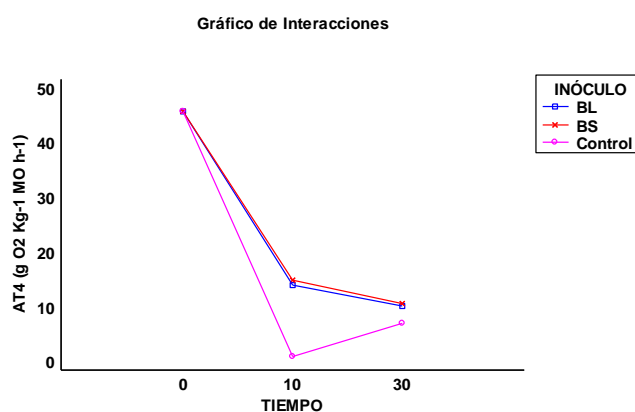


Gráfico 10: Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo x Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre los valores de AT₄. (BL: *B. licheniformis*; BS: *B. safensis*; AT₄: Índice Respirométrico Acumulado a 4 días).

4.4. Fracciones lignocelulósicas y Tasas de Biodegradación

Durante las etapas tempranas del proceso de compostaje de restos vegetales se agotan los compuestos más fácilmente degradables. Sin embargo, muchas bacterias y hongos, en etapas más avanzadas del proceso, son capaces de descomponer otros materiales poliméricos, pertenecientes a la matriz de lignocelulosa, proporcionando compuestos más solubles a toda la microbiota del entorno de la pila. No obstante, aunque la degradación de las fracciones de lignocelulosa se describe de forma secuencial, lo más probable es que ocurra simultáneamente durante todo el proceso, ya que gran parte de la microbiota de la pila de compostaje posee un carácter multifuncional (López-González et al., 2015).

A continuación, se describe la evolución de las distintas fracciones lignocelulósicas durante el tiempo que duró el ensayo de inoculación. Los resultados se muestran tanto en términos de porcentaje de hemicelulosa, celulosa y lignina, así como en términos de tasas de degradación de las distintas fracciones. Hay que tener en cuenta que el comportamiento de la matriz de lignocelulosa no puede analizarse de forma independiente al resto de parámetros analizados, ya que todos ellos, de forma conjunta influyen en la biodegradabilidad de las

muestras. Por tanto, una vez descritos los resultados de forma objetiva, se analizarán todas las variables de estudio mediante un análisis de funciones discriminantes.

4.4.1. Porcentaje de Hemicelulosa y Tasa de Biodegradación

La inoculación con ambas cepas dio lugar a un descenso continuado del porcentaje de hemicelulosa que pudo detectarse hasta el final del periodo de incubación (30 días) (Gráficos 11a y 11b), alcanzándose tasas de biodegradación, en algunos casos, cercanos al 40% (Gráficos 11c y 11d). Al igual que en parámetros anteriores, no se observó la influencia significativa de la dosis. Por otra parte, el comportamiento de las muestras no inoculadas fue muy distinto, sobre todo durante la segunda parte del periodo de incubación, ya que el porcentaje de hemicelulosa se vio incrementado después de los 10 días, lo cual se tradujo en una tasa de degradación negativa para la hemicelulosa durante este periodo en las muestras no inoculadas (Gráfico 11c y 11d).

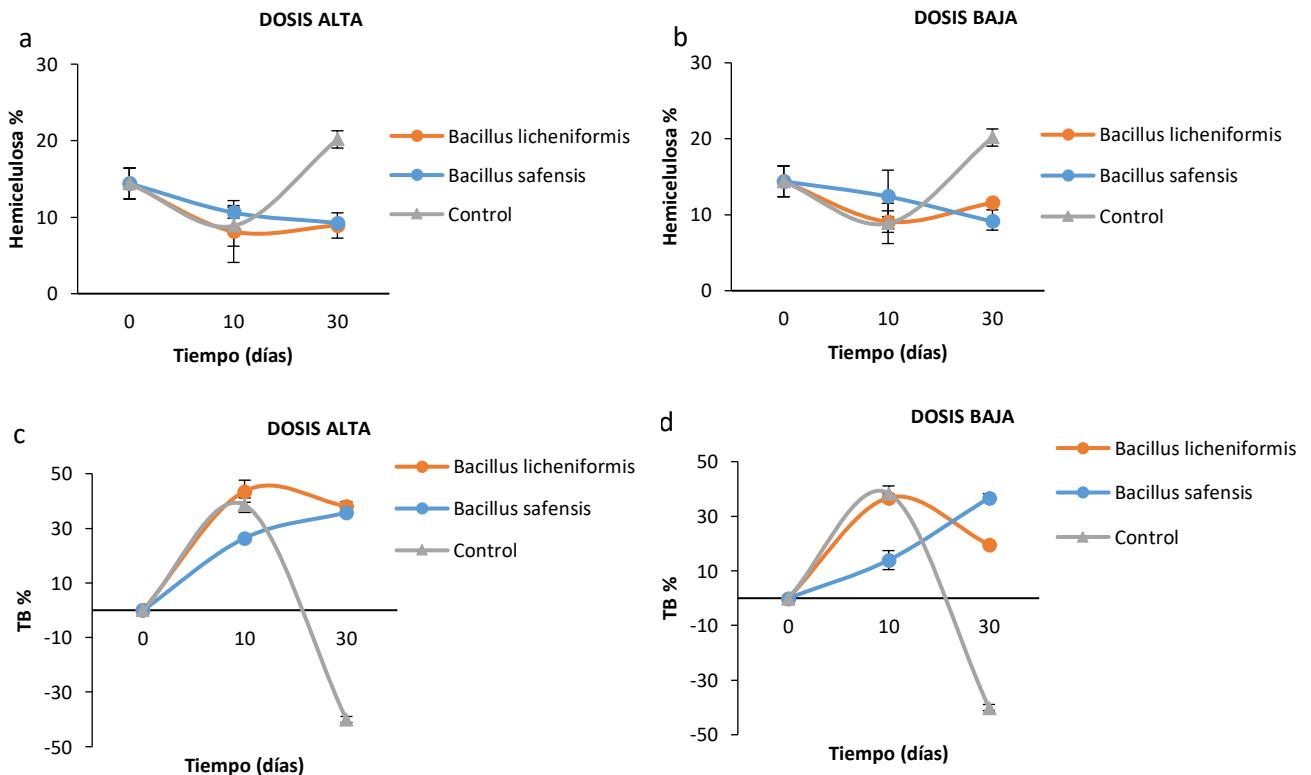


Gráfico 11: Representación de los valores del Porcentaje de Hemicelulosa y de la Tasa de Biodegradación de Hemicelulosa en relación con el tiempo de tratamiento. a) y c) dosis alta y b) y d) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular. TB: Tasa de Biodegradación.

Hay que destacar que el contenido en hemicelulosa de las muestras sin inocular sigue una tendencia similar a la observada para la relación C/N (Gráfico 7), ya que, si bien tras 10 días de incubación disminuyó la relación C/N, ésta volvió a incrementarse hacia el final del periodo de incubación, lo que podría relacionarse con un descenso de la actividad biológica y con un freno en el proceso de mineralización. Hay que tener en cuenta, además, que ambas cepas de *Bacillus* spp. habían sido previamente caracterizadas en función de su capacidad lignocelulósica, mostrando un importante potencial hemicelulolítico, lo que podría justificar el comportamiento de las mismas en las mezclas inoculadas.

Aunque la dosis de inóculo no influyó significativamente sobre la tasa de biodegradación de la hemicelulosa, el análisis estadístico de los resultados sí reveló la influencia significativa de la interacción Tiempo x Inóculo, mostrando globalmente un efecto positivo de *B. safensis* sobre dicha tasa, que fue incrementándose hasta el final del periodo de incubación (Gráfico 12).

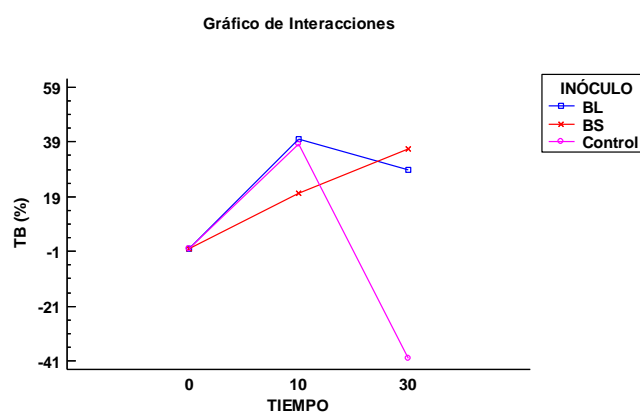


Gráfico 12: Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo x Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre los valores de TB (%) de Hemicelulosa (BL: *B. licheniformis*; BS: *B. safensis*; TB (%): Tasa de Biodegradación).

4.4.2. Porcentaje de Celulosa y Tasa de Biodegradación

En el Gráfico 13 se muestra el porcentaje de celulosa a lo largo del tiempo de incubación (Gráficos 13a y 13b), así como la tasa de degradación de este biopolímero (Gráficos 13c y 13d), tanto en las muestras inoculadas como en las mezclas control, sin inocular. Así, se pudo observar a partir de las muestras inoculadas un descenso en el contenido de celulosa después de 10 días de incubación, algo más pronunciado cuando las cepas se trataron con *B. safensis* a dosis baja (Gráfico 13b). En general, la degradación de celulosa fue más rápida en las mezclas tratadas con ambas cepas, ya que después de 10 días de incubación, se alcanzaron tasas de degradación en torno al 30-40%, significativamente superiores a lo observado en las mezclas

control. Sin embargo, en contra de lo esperado, dicha tasa fue muy superior a los 30 días en las muestras no inoculadas (Gráficos 13c y 13d), hecho que podría justificarse en base al mayor potencial de las cepas de *Bacillus* spp. para degradar la hemicelulosa, y a los posibles fenómenos de competencia que podrían estar ocurriendo en las mezclas inoculadas, conforme avanzaba el tiempo de incubación.

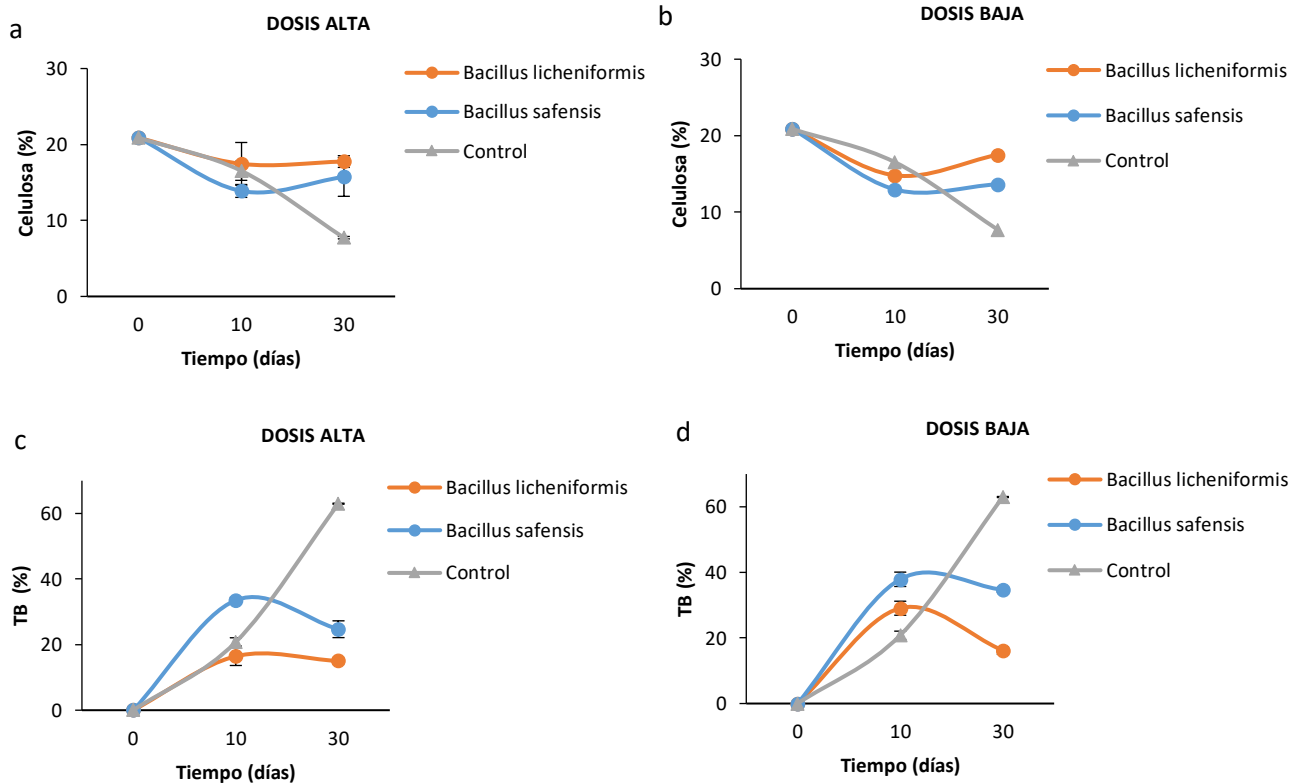


Gráfico 13: Representación de los valores del Porcentaje de Celulosa y de la Tasa de Biodegradación de Celulosa en relación con el tiempo de tratamiento. a) y c) dosis alta y b) y d) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular. TB: Tasa de Biodegradación.

El análisis de interacciones realizado a nivel estadístico reveló la influencia significativa de la interacción entre los factores Tiempo x Inóculo, pudiéndose confirmar que globalmente, la inoculación con *B. safensis* fue la más efectiva después de 10 días de incubación, en relación con la degradación de celulosa (Gráfico 14). Este hecho pudo relacionarse con un acceso más inmediato a esta fracción por parte de la microbiota presente en las mezclas, favorecido, en parte, por el potencia hemicelulolítico de *B. safensis*.

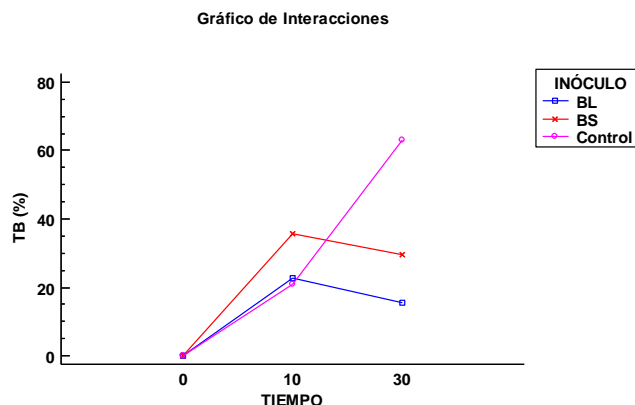


Gráfico 14: Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo x Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre los valores de TB (%) de Celulosa (BL: *B. licheniformis*; BS: *B. safensis*; TB (%): Tasa de Biodegradación).

4.4.3. Porcentaje de Lignina y Tasa de Biodegradación

Uno de los componentes principales de la materia orgánica de origen vegetal, así como el más complejo y difícil de biodegradar, es la lignina. Los resultados registrados en la literatura referidos a la degradación de las fracciones lignocelulósicas muestran una información muy diversa y, a veces, contradictoria (Haddadin et al., 2009, Wang et al., 2011). Dada la gran diversidad de materiales susceptibles de ser compostados y su composición en relación con el contenido lignocelulósico no es de extrañar que los resultados tengan a veces una compleja interpretación (Francou et al., 2008). Generalmente, la biodegradación de la lignina se produce en las fases tardías del compostaje y se suele detectar una tasa de descomposición muy baja. Además, el contenido de este polímero determina no sólo su propia descomposición sino también la de los otros componentes lignocelulósicos, celulosa y hemicelulosa. La lignina, de hecho, es capaz de actuar como factor protector de estas otras fracciones. En concreto, existe una fuerte asociación entre la lignina y la hemicelulosa, favorecida por la presencia de compuestos fenólicos (Malherbe & Cloete, 2002). Esta intrincada asociación dificulta el acceso a las enzimas implicadas en los procesos de biodegradación. Además, la lignina es considerada como uno de los principales precursores de la formación de las sustancias húmicas presentes en el suelo, ya que proporciona la estructura básica debido a su resistencia a los fenómenos edáficos de degradación (Tortosa, 2011).

A la vista de los resultados observados respecto al contenido en lignina de las muestras, cabe destacar un incremento de esta fracción transcurridos 10 días desde la aplicación de los tratamientos, así como en las muestras control. Este incremento puede deberse, no sólo a la dificultad de la lignina para ser biodegradada, sino también a la heterogeneidad de las

mezclas de partida, y a la posible concentración de la biomasa durante el tiempo que duró el ensayo.

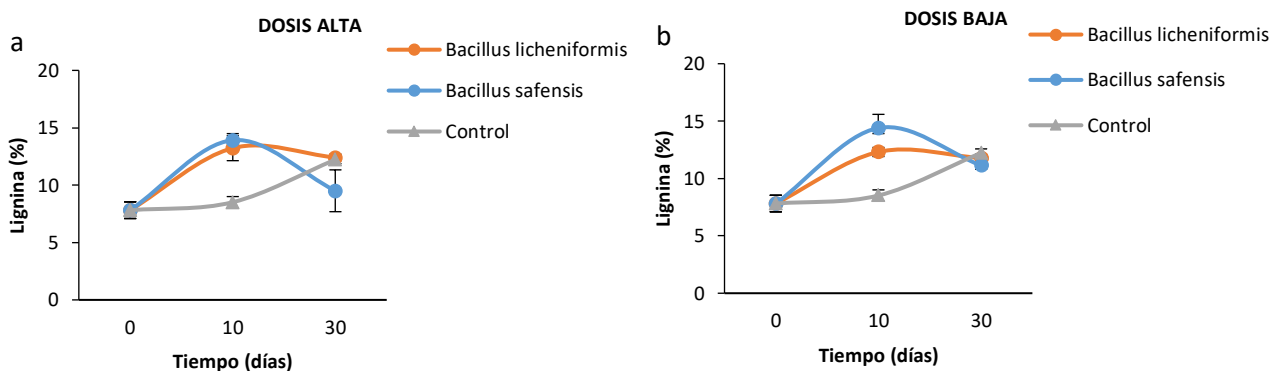


Gráfico 15: Representación de los valores del Porcentaje de Lignina en relación con el tiempo de tratamiento. a) dosis alta y b) dosis baja de *B. licheniformis*, *B. safensis* y control sin inocular. TB: Tasa de Biodegradación.

Algunos autores han podido comprobar este mismo comportamiento al inicio de procesos de compostaje de restos vegetales (Jurado et al., 2014). Aún así, después de 10 días de incubación, comenzó a detectarse un descenso en el porcentaje de lignina, sobre todo en aquellas mezclas inoculadas con *B. safensis* (Gráfico 15). Esto pudo relacionarse con una notable degradación de lignina, en algunos casos cercana al 20% (datos no mostrados), aunque de forma más tardía que lo observado para el caso de la hemicelulosa y celulosa, lo cual era de esperar, teniendo en cuenta la resistencia a la biodegradación de la molécula de lignina. Respecto a las muestras control, no se detectó degradación de lignina en ninguno de los muestreos realizados.

Es posible que las mayores tasas de biodegradación de hemicelulosa y celulosa durante las primeras semanas de tratamiento favorecieran, a su vez, la liberación de lignina del entramado de lignocelulosa, y de este modo se comenzara a degradar en fases más tardías del ensayo. Lo que si resulta evidente es que la aplicación de ambos tratamientos biológicos, *B. licheniformis* y *B. safensis*, sobre residuos vegetales moviliza de algún modo la compleja red formada por hemicelulosa, celulosa y lignina. El análisis de funciones discriminantes mostrado en el Gráfico 16, para todas las variables de estudio, muestra cómo la Función 1 puede explicar más del 95% de los resultados obtenidos. En este Gráfico los datos se agrupan en función del tipo de tratamiento, lo que sirve para confirmar que la aplicación de ambas cepas dio lugar a perfiles de biodegradación diferentes a los observados en el caso de las mezclas sin tratar. Dado el potencial biotecnológico que poseen ambas cepas, no se descarta la posibilidad de aplicar un tratamiento combinado, a modo de consorcio microbiano, basado en la utilización de ambos microorganismos.

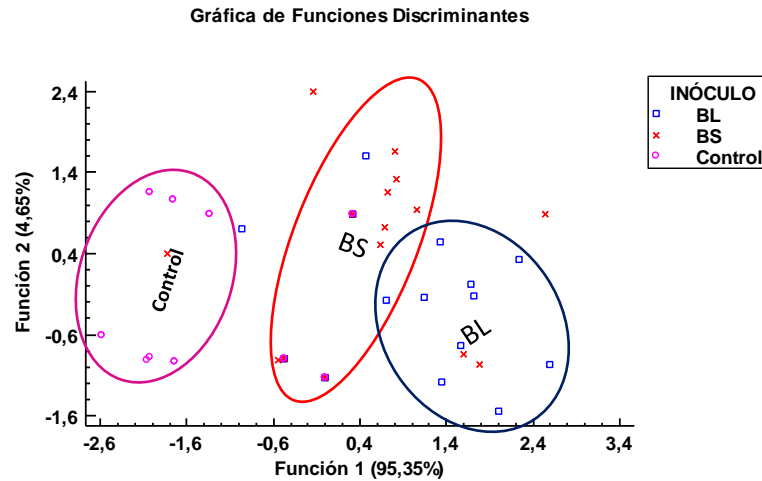


Gráfico 16: Representación del Análisis de Funciones Discriminantes para todas las variables de estudio, en función del tratamiento. BL: *B. licheniformis*, BS: *B. safensis* y control sin inocular.

5. Conclusiones

Una vez analizados los resultados, se indican a continuación las conclusiones derivadas del trabajo realizado:

- El tratamiento con las cepas *B. licheniformis* 1974 y *B. safensis* 190 afectó a la biodegradabilidad de las mezclas inoculadas después de 10 días de incubación, lo que se tradujo en valores de AT_4 superiores a los observados en las muestras no tratadas, así como en una leve reducción de la relación C/N y del contenido en Materia Orgánica.
- La inoculación con ambas cepas aceleró la degradación de la celulosa en comparación a lo observado en los controles sin inocular, mientras que la degradación de hemicelulosa y lignina fue más notable después de 10 días desde la aplicación de ambos tratamientos.
- La aplicación de *B. safensis* 190 como tratamiento biológico previo al proceso de compostaje se propone como método de activación de la degradación de residuos lignocelulósicos a corto plazo, ya que a dosis de 10^6 UFC/g de residuo se incrementan los valores de AT_4 y se acelera la degradación de la celulosa casi de forma inmediata. Además, a medio plazo, puede favorecer la degradación de lignina y hemicelulosa, en relación con lo observado en los materiales sin inocular.

6. Financiación

Este trabajo ha sido financiado gracias al proyecto UAL2020-BIO-B1964 (Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidad).

7. Bibliografía

- Anónimo. (2020). Hongos de la Madera: Tipos, Efectos y Tratamiento. Maderame. Recuperado de <https://maderame.com/hongos-madera/>. Consultado en mayo 2022.
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J., & Beck, A. J. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions. *Environmental Pollution*, 141(3), 459-468.
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J., & Beck, A. J. (2006). Investigation of organic matter dynamics during in-vessel composting of an aged coal-tar contaminated soil using fluorescence excitation–emission spectroscopy. *Chemosphere*, 64(5), 839-847.
- Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S., & Thami Alami, I. (2018). Composting parameters and compost quality: A literature review. *Organic Agriculture*, 8(2), 141-158.
- Barrington, S., Choinière, D., Trigui, M., & Knight, W. (2002). Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. *Bioresource Technology*, 83(3), 189-194.
- Cajamar, Análisis de estudios agroalimentarios. (2021). Análisis de la campaña hortofrutícola de Almería 2020-2021.
- Cariello, M. E., Castañeda, L., Riobo, I., & González, J. (2007). Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso compostaje de residuos sólidos urbanos. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 7(3), 26-37.
- Castaldi, P., Alberti, G., Merella, R., & Melis, P. (2005). Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management*, 25(2), 209-213.
- Chávez, Á., & Rodríguez, A. (2016). Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica. *Academia y Virtualidad*, 9(2), 90-107.
- Cortez, T. (2013). Evaluación de pretratamiento con líquidos iónicos Próticos para la producción de bioetanol de segunda Generación. Memoria de tesis. Universidad de Chile, Chile.

- Dalia, S., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228.
- Estrella-González, M. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A. B., Muñoz-Mérida, A., & Moreno, J. (2020). Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale. *Bioresource Technology*, 313, 123557.
- Fan, Y., Lee, C. T., Ho, C., Klemeš, J., Wahab, R., Chua, L. S., & Sarmidi, M. (2017). Evaluation of Microbial Inoculation Technology for Composting. *Chemical Engineering Transactions*, 56, 433-438.
- Francou, C., Linères, M., Derenne, S., Le Villio-Poitrenaud, M., & Houot, S. (2008). Influence of green waste, biowaste and paper-cardboard initial ratios on organic matter transformations during composting. *Bioresource technology*, 99(18), 8926-8934.
- Gallego, L., Navarrete, B., & González, R. (2019). Residuos agrícolas de invernadero como biocombustible para la industria. Almería, fuente de energía-Artículos y Reportajes. Recuperado de <https://www.retema.es/>. Consultado en abril 2022.
- García, C., & Hernández, T. (2018). Fertilizantes/enmiendas orgánicas basadas en residuos orgánicos: Su futuro en una agricultura sostenible. Interempresas. Recuperado de <https://www.interempresas.net/Grandes-cultivos/Articulos/208032-Fertilizantes-enmiendas-organicas-basadas-residuos-organicos-futuro-agricultura-sostenible.html>. Consultado en mayo 2022.
- Greff, B., Szigeti, J., Nagy, Á., Lakatos, E., & Varga, L. (2022). Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review. *Journal of Environmental Management*, 302 (B), 114088.
- Guisado, G. (2008). Aislamiento y selección de microorganismos de interés industrial y/o ambiental a partir de materiales sometidos a compostaje. Memoria de tesis. Universidad de Almería. Almería, España
- Haddadin, M. S., Haddadin, J., Arabiyat, O. I., & Hattar, B. (2009). Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource technology*, 100(20), 4773-4782.
- Hemati, A., Aliasghar zad, N., & Khakvar, R. (2018). In vitro evaluation of lignocellulolytic activity of thermophilic bacteria isolated from different composts and soils of Iran. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 424-430.

- Hernández-Gerónimo, G., Laines-Canepa, J., Ávila-Lázaro, I., Solís-Sílván, R., & Sosa Olivier, J. (2022). Stoichiometric calculations of emission factors to estimate fugitive greenhouse gases emissions of a solid waste management center. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 165-179.
- Hoorweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). *What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management*. World Bank.
- Hue, N. V., & Liu, J. (1995). Predicting compost stability. *Compost science & utilization*, 3(2), 8-15.
- Iglesias-Jiménez, E., Barral, M. T., & Egea, F. (2008). Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. *Compostaje*, 243.
- Jędrzak, A. (2018). Composting and Fermentation of Biowaste—Advantages and Disadvantages of Processes. *Civil and Environmental Engineering Reports*, No. 28(4), 71-87.
- Junta de Andalucía. (2010). *Plan Director Territorial de Gestión de Residuos No Peligrosos de Andalucía (2010-2019)*.
- Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. (2014). Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *Journal of environmental management*, 133, 355-364.
- Takezawa, M., Mimura, A., & Takahara, Y. (1992). Application of two-step composting process to rice straw compost. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(1), 43-50.
- Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular, Pub. L. No. Ley 7/2022, BOE-A-2022-5809 48578 (2022).
- López, J. C., Pérez, C., & Acien, G. (2016). Residuos vegetales procedentes de los invernaderos de Almería. Recuperado de <https://www.cajamar.es/storage/documents/017-restos-vegetales-1466406472-2d5fa.pdf>. Consultado en junio 2022.
- López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., Jurado, M. M., & Moreno, J. (2015). Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology*, 175, 406-416.
- López-González, J. A., Vargas-García, M. C., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., & Moreno, J. (2014). Enzymatic characterization of microbial isolates from lignocellulose waste composting: chronological evolution. *Journal of Environmental Management*, 145, 137-146.

- Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(2), 105-114.
- Márquez, P. B., & Blanco, M. J. (2018). Capítulo 4. Factores que afectan al proceso de Compostaje. Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva. Recuperado de <https://cutt.ly/UnvsrkT>. Consultado en junio 2022.
- Moreno, J., & Moral, R. (2008). Compostaje. Ed. Mundi-Prensa Libros, Madrid. 570 pp.
- Mustin, M. (1987). *Le compost: Gestion de la matière organique. Organique*. Editions F. Dubusc, Paris, 954.
- Obsa, O., Tadesse, M., Kim, D.-G., Asaye, Z., Yimer, F., Gebrehiwot, M., Brüggemann, N., & Prost, K. (2022). Organic Waste Generation and Its Valorization Potential through Composting in Shashemene, Southern Ethiopia. *Sustainability*, 14(6), 3660.
- Páez, O. (2021). Compost y Compostaje: Conceptos básicos. OPA Natura. Recuperado de <https://opanatura.com/compost-y-compostaje/>. Consultado en mayo 2022.
- Pascual, J. A., Morales, A. B., Ayuso, L. M., Segura, P., & Ros, M. (2018). Characterisation of sludge produced by the agri-food industry and recycling options for its agricultural uses in a typical Mediterranean area, the Segura River basin (Spain). *Waste Management*, 82, 118-128.
- Rahman, N. H. A., Abd Aziz, S., & Hassan, M. A. (2013). Production of ligninolytic enzymes by newly isolated bacteria from palm oil plantation soils. *BioResources*, 8(4), 6136-6150.
- Ramos, P. M., & Gil, J. M. (2017). Biorrefinerías basadas en explotaciones agropecuarias y forestales. Palencia, España: Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón.
- Rombel, A., Krasucka, P., & Oleszczuk, P. (2022). Sustainable biochar-based soil fertilizers and amendments as a new trend in biochar research. *Science of the Total Environment*, 816, 151588.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., & Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 127-137.
- Sethi, A., & Scharf, M. E. (2013). Biofuels: Fungal, Bacterial and Insect Degradors of Lignocellulose. En *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Stevenson, F. J. (1994). *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2ª Edición. John Wiley & Sons, 512 pp.

- Surabhi, K., Rangeshwaran, R., Frenita, M. L., Shylesha, A. N., & Jagadeesh, P. (2018). Isolation and characterization of the culturable microbes associated with gut of adult dung beetle *Onitis philemon* (Fabricius). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 27, 1609-1614.
- Suthar, S., & Kishore Singh, N. (2022). Fungal pretreatment facilitates the rapid and valuable composting of waste cardboard. *Bioresource Technology*, 344 (A), 126178.
- Tierra, P. (2022). La conexión sostenible: Residuos y economía circular en agricultura intensiva. Plataforma Tierra. Recuperado de <https://www.plataformatierra.es/innovacion/la-conexion-sostenible-residuos-y-economia-circular-en-agricultura-intensiva/>. Consultado en mayo 2022.
- Tomati, U., Madejon, E., & Galli, E. (2000). Evolution of humic acid molecular weight as an index of compost stability. *Compost Science & Utilization*, 8(2), 108-115.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., & Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource technology*, 72(2), 169-183.
- Valera, D., Belmonte, L., Molina, F., & López, A. (2014). Los invernaderos de Almería Análisis de su tecnología y rentabilidad. *Cajamar Caja Rural*. Almería, España.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895-905.
- Vázquez, P. E. (2013). Uso en la agricultura de sustancias húmicas. Caso de Estudio. Memoria para la obtención del Grado de especialización en Química Aplicada. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo, Coahuila, México.
- Villar, I. (2017). Estudio de la dinámica microbiana durante la fase de maduración del compostaje de residuos orgánicos. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. Vigo, España.
- Wang, H., Fan, B., Hu, Q., & Yin, Z. (2011). Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 102(24), 11189-11193.
- Wang, K., Cao, R., Wang, M., Lin, Q., Zhan, R., Xu, H., & Wang, S. (2019). A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 48.
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T. A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., Zhao, Y., & Song, C. (2022). Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of

- lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere*, 286 (1), 131635.
- Wu, Y., Chen, Y., Shaaban, M., Zhu, D., Hu, C., Chen, Z., & Wang, Y. (2019). Evaluation of microbial inoculants pretreatment in straw and manure co-composting process enhancement. *Journal of Cleaner Production*, 239, 118078.
- Xu, J., Xu, X., Liu, Y., Li, H., & Liu, H. (2016). Effect of microbiological inoculants DN-1 on lignocellulose degradation during co-composting of cattle manure with rice straw monitored by FTIR and SEM. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(2), 345-351.
- Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Han, H., Zhao, S., Kakade, A., Khan, A., Du, D., & Li, X. (2018). Lignin depolymerization and utilization by bacteria. *Bioresource Technology*, 269, 557-566.
- Zhang, Z., Shah, A. M., Mohamed, H., Tsiklauri, N., & Song, Y. (2021). Isolation and Screening of Microorganisms for the effective pretreatment of lignocellulosic agricultural wastes. *BioMed Research International*, Article ID 5514745.